

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

VIVIANE PAULA MARTINI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE NOVAS LIPASES
OBTIDAS POR PROSPECÇÃO METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM
BIOCATÁLISE**

**CURITIBA
2012**

VIVIANE PAULA MARTINI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE NOVAS LIPASES
OBTIDAS POR PROSPECÇÃO METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM
BIOCATÁLISE**

**Tese Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do Paraná,
como requerimento parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Química Orgânica.**

**Orientadora: Professora Dra. Nadia Krieger
Co-orientador: Professor Dr. Jorge Iulek**

**CURITIBA
2012**

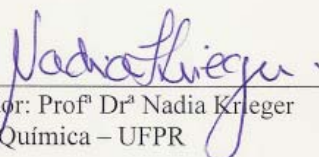
TERMO DE APROVAÇÃO


CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE NOVAS LIPASES OBTIDAS POR
PROSPECÇÃO METAGENÔMICA COM APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE

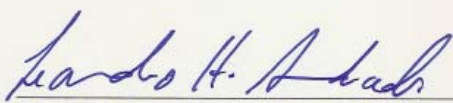
por

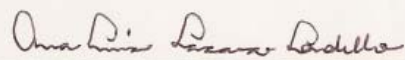
VIVIANE PAULA MARTINI

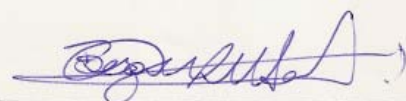
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:


Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Nadia Krieger
Dep. de Química – UFPR


Prof. Dr. Hernan Francisco Terenzi
Dep. de Química – UFSC


Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
Instituto de Química – USP


Prof.^ª Dr.^ª Ana Luisa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR


Prof.^ª Dr.^ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 05 de junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos orientadores Professores Nadia Krieger e Prof. Jorge Iulek pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela orientação.

À Professora Jaísa Fernandes Soares e ao Professor Emanuel Maltempi de Souza, que acreditaram e aprovaram esse projeto, em especial ao Professor Emanuel Maltempi de Souza e em extensão ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa que permitiram minha permanência na Bioquímica para o desenvolvimento desse trabalho. Ainda, ao Professor Emanuel pelas sugestões e críticas que muito contribuíram para esse.

Ao Arnaldo Glogauer pela amizade, paciência e ensino, sendo um verdadeiro tutor durante todos esses anos de doutorado, embora reconheça a minha incompletude de conhecimento e muito ainda a aprender.

Ao Professor Marcelo Müller e Marco Antônio Kadowaki pela amizade e auxílio nos experimentos e nas discussões desse trabalho.

Ao Valter Antônio de Baura pela amizade e pelo auxílio no seqüenciamento e na etapa de purificação das proteínas, além das inúmeras contribuições que prestou neste trabalho e que presta em outros trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Fixação de Nitrogênio - Bioquímica, sem contar o seu jeito espontâneo que alegam o ambiente de trabalho.

À Roseli Prado pelo auxílio técnico, pelo carinho e amizade. Dona Rose, assim chamada carinhosamente por todos, é uma pessoa muito especial, um pedacinho dela está presente em todos os trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

Ao Pós-Doutorando Humberto D'Muniz Pereira e Prof Dr. Eduardo Horjaless-Reboredo do IFSC-USP pela ajuda no robô de cristalização e na coleta dos dados de difração de raios X.

Aos Professores banca de qualificação de minha tese, Braz Heleno de Oliveira, Ana Luísa Lordello e Marcelo Müller pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Aos Professores Leandro H. Andrade, Hernan F. Terenzi, Ana Luísa L. Lordello e Beatriz H. L. N. S. Maia pelo aceite ao convite e por sua avaliação.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Química em especial ao coordenador Professor Aldo Zabin sempre prestativo e atencioso em nossas necessidades e ao secretário Marcelino aos serviços prestados durante esses anos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos amigos do Anexo - Bioquímica, Arnaldo, Michelle, Sarah, Maria Augusta, Anelis, Bruno, Adriano, Helison, Eduardo e Marcelo Batista, fica a saudade com quem passei a maior parte do tempo e momentos felizes. Aos demais colegas de laboratório 271, 275, em especial a Bel e a Sarinha por nossos cafés gostosos e nossa amizade de sempre. A Day por nossas conversas conflituosas, filosóficas e engraçadas. A Tuquinha e Dan nossa caravana de quinta-feira de Evangelho-terapia. Aos amigos do NPDEAS e LTEB, Aline, Diniara, Vanderléia, Christiane, Robson, Jonas, Allen, Alessandra, Daniele. Em especial minhas amigas queridas Dini e Aline pelo auxílio na caracterização e imobilização da enzima. Ao Robson pela continuidade ao trabalho ora aqui iniciado. A Vanda pelo carinho, amizade e pelas suas ajudas valiosas nas apresentações. Enfim, a todos meus amigos queridos, meu carinho e meu agradecimento por tê-los conhecido e dividido um parte de minha vida com vocês.

As irmãs de coração, carinhosamente chamadas de Marias, Bel, Sandrinha, Vanda, Dila, Edi, Paty I, Paty II, Taty, Pri, Jacque, Lucia, Allen, Aline, pelo convívio no lar que fez com que a distância e a saudade de casa fosse amena, bem como a própria D. Maria sempre gentil e bondosa com seu jeito especial.

Aos meus pais pelo apoio e amor sempre esbanjado na forma de atenção e incentivo ao progresso. Muito obrigada mãe pelas suas orações. Deus me presenteou com dois Faróis que são vocês, que iluminam, esclarecem e auxiliam sempre mostrando o melhor caminho a seguir.

Ao Jorge, pelo amor, paciência, atenção, dedicação que tem prestado durante todos esses anos de convivência, auxiliando no meu desenvolvimento intelectual e moral, pelo seu exemplo de generosidade e ser humano.

“Por um poder imortal,
todas as coisas, perto ou distantes,
ocultamente estão ligadas entre si.

Tão ligadas estão,
que não se pode tocar uma flor
sem incomodar as estrelas.”

Francis Thompson

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR ESTERASES E LIPASES.	3
FIGURA 2 - MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES.	5
FIGURA 3 - MODELO POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 COM A TAMPA HIDROFÓBICA (<i>LID</i>) REPRESENTADA NA COR CINZA.....	6
FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia glumae</i> COMPLEXADA COM SUA FOLDASE.	10
FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	12
FIGURA 6 - OBTENÇÃO DO (S)- IBUPROFENO	14
FIGURA 7 - CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA	17
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DA LIPASE ADORVIDA EM SUPORTE HIDROFÓBICO	23
FIGURA 9 - ESTRATÉGIA E VISÃO GERAL DESTE TRABALHO	26
FIGURA 10 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS SUBSTRATOS, (A) TRIBUTIRINA (C4), (B) TRICAPRILINA (C8) E (C) TRIOLEÍNA (C18).	28
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS ADOTADAS PARA CLONAGEM DOS GENES <i>lipC6G9</i> E <i>lifC6G9</i> INTEIRAS OU TRUNCADAS NOS RESPECTIVOS VETORES DE EXPRESSÃO	36
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CO-EXPRESSÕES DOS GENES <i>lipC6G9</i> E <i>lifC6G9</i> TESTADAS EM DIFERENTES VETORES DE EXPRESSÃO	40
FIGURA 13- EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	49
FIGURA 14- ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu^{2+} E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO	52
FIGURA 15 - ELETROFOREGRAMA SDS-PAGE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DE LIPC12 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	54
FIGURA 16 - CRISTAIS DA LIPASE LipC12 OBTIDOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO DE VAPOR.....	55
FIGURA 17 - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN OBTIDO PELO PROGRAMA PROCHECK (LASKOWSKI <i>et al.</i> 1993)	58
FIGURA 18- Ser ⁸³ CATALÍTICA E SUA DENSIDADE ELETRÔNICA NA ESTRUTURA DE LipC12	59

FIGURA 19- QUALIDADE DO AJUSTE NA DENSIDADE ELETRÔNICA PARA A ESTRUTURA LipC12.....	59
FIGURA 20 - LIGAÇÃO CIS-PEPTÍDICA ENTRE Gln ²⁶⁶ -Leu ²⁶⁷ PRESENTE NA ESTRUTURA DE LipC12	60
FIGURA 21 - PROVÁVEL SÍTIO DE LIGAÇÃO DE ÍON CÁLCIO, APRESENTANDO OS RESÍDUOS Asp ²¹⁷ E Asp ²⁶² PRÓXIMOS À His ²⁶⁰ EM COR VERDE PARA A LipC12 E SEUS CORRESPONDENTES PARA A PAL (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) EM COR AZUL	61
FIGURA 22- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE (A) LipC12 E (B) LipC12 SOBREPOSTA À DE PAL [LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CÓDIGO PDB 1EX9)]	62
FIGURA 23 – TRIÁDE CATALÍTICA DE LipC12, RESÍDUOS Ser ⁸³ , Asp ²³⁸ e His ²⁶⁰ , SOBREPOSTA À DE PAL	62
FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DA POSIÇÃO DE Gly ¹⁵ ENTRE AS ESTRUTURAS DE LipC12 E PAL (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	63
FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESÍDUOS Leu ¹⁶ DE LipC12 E Met ¹⁶ DE PAL (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	64
FIGURA 26 – COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE OS RESÍDUOS Trp ¹⁸⁴ E Tyr ²⁴⁴ DE LipC12 E Cys ¹⁸³ -Cys ²³⁵ (PONTE DISSULFETO) DE PAL (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)....	65
FIGURA 27 – ATIVIDADE DE DIFERENTES CLONES EM PLACAS CONTENDO TRIOLEÍNA.....	66
FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS GENES DA LIPASE (<i>lip</i>) OU DA ESTERASE (<i>est</i>) E SUAS FOLDASES (<i>lif</i>)	67
FIGURA 29 - ELETROFOREGRAMA EM GEL DE AGAROSE DOS GENES <i>lipC6G9</i> E <i>lifC6G9</i> AMPLIFICADOS POR PCR	70
FIGURA 30 - ELETROFOREGRAMA EM GEL DE AGAROSE 1% PARA O CLONE pT7-7- <i>lifC6G9</i> inteiro.....	71
FIGURA 31 - ELETROFOREGRAMA SDS-PAGE PARA EXPRESSÃO DA LIPASE LipC6G9 e DA FOLDASE LifC6G9 e DA CO-EXPRESSÃO Lip-LifC6G9	72
FIGURA 32- ELETROFOREGRAMAS SDS-PAGE APÓS PURIFICAÇÃO DA LIPASE LipC6G9 COMPLEXADA À SUA FOLDASE (LIFC6G9)	76
FIGURA 33 - ZIMOGRAMA DO COMPLEXO Lip-LifC6G9 PURIFICADO	78
FIGURA 34 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA LIPASE.....	79
FIGURA 35 – ALINHAMENTO DA LIPASE LipC6G9 COM ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE LIPASES DO <i>PROTEIN DATA BANK</i> (PDB).....	81

FIGURA 36 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9	86
FIGURA 37 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9	87
FIGURA 38 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE	92
FIGURA 39 – PROTEÍNA RESIDUAL DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 EM ACCUREL MP-1000.....	92
FIGURA 40 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM <i>N</i> -HEPTANO CATALISADA POR Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000.....	97
FIGURA 41 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM <i>N</i> -HEXANO CATALISADA POR Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000.....	97
FIGURA 42 - ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA	98
FIGURA 43 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ESTABILIDADE DE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE LIPASES DETERMINADAS POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X.....	7
TABELA 2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE LIPASES BACTERIANAS.....	9
TABELA 3 – EXEMPLOS DE EMPREGO DAS LIPASES EM DIVERSAS REAÇÕES.....	15
TABELA 4 – EXEMPLOS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS OBTIDAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	18
TABELA 5 - PARES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>lipC6G9</i> E <i>lifC6G9</i>	35
TABELA 6 - LIGAÇÕES DOS VETORES pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7 COM OS INSERTOS DOS GENES <i>lipC6G9</i> E <i>lifC6G9</i>	38
TABELA 7 - CO-TRANSFORMAÇÕES DO GENE DA LIPASE <i>lipC6G9</i> E DO GENE DA FOLDASE <i>lifC6G9</i> NOS VETORES DE EXPRESSÃO pET29b(+), pET28a(+) E pT7-7 ..	39
TABELA 8 - SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE LipC12.....	53
TABELA 9 - DADOS DE COLETA E DADOS ESTATÍSTICOS DO PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PARA O CRISTAL DA LIPASE LipC12	56
TABELA 10 - SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS GENES SELECIONADOS E SEQÜENCIADOS.....	68
TABELA 11 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 E DE SUA FOLDASE (LifC6G9) ANTES DA PURIFICAÇÃO	74
TABELA 12 - ATIVIDADES DA LIPASE Lip-LifC6G9 COMPARADA ÀS DA LIPASE LipC12 PARA DIFERENTES SUBSTRATOS.....	83
TABELA 13 – ESTRATÉGIA DE REDOBRAMENTO DE LIPASES UTILIZADA EM ALGUNS TRABALHOS	85
TABELA 14 - ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS HIDROFÍLICOS.....	88
TABELA 15 – ESTABILIDADE DE ALGUMAS LIPASES FRENTE A SOLVENTES POLARES A 30 °C	90
TABELA 16 - EFICIÊNCIA E RETENÇÃO DE ATIVIDADE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Lip-LifC6G9 OFERECIDAS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO	93
TABELA 17 - ATIVIDADES DE HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO PARA Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA	96

TABELA 18 – COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA.....	100
--	-----

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES TEMPERATURAS DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA.....	101
--	-----

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XV
GLOSSÁRIO	XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. LIPASES	3
2.1.2 <i>Estruturas Tridimensionais de Lipases</i>	5
2.1.3 <i>Famílias de Lipases Bacterianas</i>	8
2.2. APLICAÇÕES DE LIPASES EM BIOCATÁLISE	11
2.3 PROSPECÇÃO METAGENÔMICA COMO FERRAMENTA PARA OBTENÇÃO DE NOVAS LIPASES	15
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	20
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 ESTRATÉGIA DO TRABALHO	25
4.2 MICRORGANISMOS, VETORES, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES OU PRIMERS	27
4.2.1 <i>Meios de cultivo</i>	27
4.2.2 <i>Antibióticos</i>	27
4.2.3 <i>Reagentes e Materiais Consumíveis</i>	28
4.3 BIBLIOTECA METAGENÔMICA	29
4.4 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA LIPASE LipC12	30
4.4.1 <i>Superexpressão, Purificação e Cristalização de LipC12</i>	30
4.4.2 <i>Coleta de Dados de Difração de Raios X, Substituição Molecular, Refinamento e Validação da Estrutura de LipC12</i>	31
4.5 SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA SCGA	32
4.5.1 <i>Triagem para Atividade Lipolítica Utilizando Métodos de Alto Desempenho</i>	32
4.5.2 <i>Seqüenciamento dos Clones lipC6-lifC6, lipG9-lifG9 e estD12-lifD12</i>	33

4.6 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA LIPASE LipC6G9 E DE SUA FOLDASE LifC6G9.....	35
4.6.1 Amplificação dos Genes <i>lipC6G9</i> e <i>lifC6G9</i>	35
4.6.2 Preparação dos Vetores com as Enzimas de Restrição <i>NdeI</i> e <i>HindIII</i> ...	37
4.6.3 Ligação e Clonagem dos Genes <i>lipC6G9</i> e <i>lifC6G9</i> nos Vetores <i>pET28a(+)</i> , <i>pET29b(+)</i> e <i>pT7-7(+)</i>	37
4.6.4 Testes de Expressão das Proteínas LipC6G9 e LifC6G9.....	38
4.6.5 Co-expressão de LipC6G9 e LifC6G9.....	39
4.7 TESTES DE ATIVIDADE PARA AS CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 e FOLDASE LifC6G9	40
4.7.1 Superexpressão, Purificação e Caracterização de Lip-LifC6G9.....	41
4.7.2 Confirmação das Bandas de Expressão de Lip-LifC6G9.....	43
4.7.3 Zimograma de Lip-LifC6G9.....	43
4.7.4 Análise Filogenética e Estimativa da Estrutura Secundária da Lipase LipC6G9	44
4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE	44
4.8.1 Especificidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Diferentes Substratos	45
4.8.2 Efeito da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9.....	45
4.8.3 Efeito do pH na atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9.....	45
4.8.4 Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Solventes Orgânicos Hidrofílicos	46
4.8.5 Imobilização da Lipase Lip-LifC6G9 em Accurel MP-1000	46
4.9 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA	48
4.9.1 Atividade de Hidrólise em meio Aquoso e Orgânico para Trioleína.....	48
4.9.2 Atividade de Esterificação	49
4.9.3 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Solventes Orgânicos.....	49
4.9.4 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Diferentes Temperaturas	50
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	50
4.10.1 Eletroforese SDS-PAGE.....	50
4.10.2 Determinação da Concentração de Proteínas.....	51
4.10.3 Determinação de Atividade Enzimática: Método Titulométrico.....	51
4.10.4 Método de Lowry-Tinsley	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA LIPASE LipC12	53
5.1.1 Superexpressão, Purificação e Cristalização de LipC12	53
5.1.2 Processamento dos Dados de Difração de Raio X e Substituição Molecular.....	55
5.1.3 Refinamento e o Modelo da Estrutura Cristalográfica de LipC12.....	57
5.2 SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA SCGA	66
5.2.1 Triagem de Atividade Lipolítica Utilizando Métodos de Alto Desempenho	66

5.2.2 Seqüenciamento e Identificação dos Genes <i>lipC6-lifC6</i> , <i>lipG9-lifG9</i> e <i>estD12-lifD12</i>	67
5.2.3 Desenho dos Primers para os Genes <i>estD12-lifD12</i> e <i>lipC6G9-lifC6G9</i> .	69
5.3 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA LIPASE LipC6G9 E DE SUA FOLDASE LifC6G9.....	70
5.3.1 Amplificação, Ligação e Clonagem dos Genes <i>lipC6G9</i> e <i>lifC6G9</i>	70
5.3.2 Testes de Expressão das Proteínas LipC6G9 e LifC6G9.....	72
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA AS EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 ISOLADA E CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 COM A FOLDASE LifC6G9	73
5.4.1 Superexpressão, Purificação e Caracterização de Lip-LifC6G9.....	75
5.4.2 Zimograma do Complexo Lip-LifC6G9.....	77
5.4.3 Análise Filogenética e Estimativa da Estrutura Secundária da Lipase LipC6G9	78
5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE	82
5.5.1 Atividade da Lipase Lip-LifC6G9 para Diferentes Substratos	82
5.5.2 Efeito da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9	85
5.5.3 Efeito do pH na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9	87
5.5.4 Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Solventes Orgânicos Hidrofílicos	88
5.5.5 Imobilização da Lipase Lip-LifC6G9 em Accurel.....	91
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA	95
5.6.1 Atividade de Hidrólise em meio Aquoso e Orgânico para Trioleína.....	95
5.6.2 Atividade de Esterificação	96
5.6.3 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Solventes Orgânicos.....	98
5.6.4 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Diferentes Temperaturas	100
6. CONCLUSÕES	102
7. PERSPECTIVAS.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amp	- Ampicilina
bp	- Pares de base
Cm	- Cloranfenicol
DO₆₀₀	- Densidade óptica ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
DNTP	- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados, com as 4 bases adenina, citosina, guanina e timina, misturadas
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DMSO	- Dimetil sulfoxido
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
estC12	- Gene da esterase C12
EstC12	- Proteína esterase C12
IPTG	- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
$I/\sigma(I)$	- Relação sinal / ruído, indica a qualidade das intensidades medidas em relação ao desvio padrão estimado
His	- Histidina
kpb	- Quilopares de base
KM	- Canamicina
LA	- Luria Bertani ágar, meio de cultura contendo 10 g L^{-1} triptona, 5 g L^{-1} extrato de levedura, 10 g L^{-1} NaCl e 13 g L^{-1} ágar.
LB	- Luria Bertani, meio de cultura contendo 10 g L^{-1} triptona, 5 g L^{-1} extrato de levedura e 10 g L^{-1} NaCl.
lipC6G9	- Gene da lipase C6G9
LipC6G9	- Proteína lipase C6G9
lifC6G9	- Gene da foldase C6G9
LifC6G9	- Proteína foldase C6G9
lifD12	- Gene da foldase D12
LifD12	- Proteína foldase D12
Lip-LifC6G9	- Complexo lipase C6G9 foldase C6G9, ambas N-truncadas
log P	- Logarítmo do coeficiente de partição (coeficiente de partição P corresponde a um padrão octanol/água do sistema de duas fases)
NCBI	- <i>Nacional Center for Biological Information</i> (USA)
MALDI-TOF	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ou Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser
MES	- Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
ORP ou ORF	- <i>Open read frame</i> ou sequência de leitura aberta, isto é, série de códons que é, ou pode ser um gene.
PAL	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em cadeia da polimerase
PDB	- <i>Protein Data Bank</i> ou Banco de Dados de Proteínas
pET28a(+)-lipC6G6trunc	- Lipase C6G9 N-truncada clonada no vetor pET28a(+), (cauda His N-terminal)
pET28a(+)-lipC6G6int	- Lipase C6G9 inteira clonada no vetor pET28a(+), (cauda His N-terminal)
pET29b(+)-lipC6G6trunc	- Lipase C6G9 N-truncada clonada no vetor pET29b(+), (cauda His C-terminal)
pET29b(+)-lipC6G6int	- Lipase C6G9 inteira clonada no vetor pET29b(+), (cauda His C-terminal)

pT7-7- lifC6G9trunc	- Foldase C6G9 N-truncada clonada no vetor pT7-7 (sem cauda His)
pT7-7- lifC6G9int	- Foldase C6G9 inteira clonada no vetor pT7-7 (sem cauda His)
pNPP	- Método espectrofotométrico para determinar a atividade lipolítica, baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila pela enzima
R_{symm} /R_{merge}	- Erro promediado de uma intensidade medida comparado à intensidade média, sobre o grupo de reflexões escolhidas
RSCC	- Valor do coeficiente de correlação do espaço real
RSR	- Valor residual no espaço real
R	- Índice residual, é usado para medir o ajuste de uma estrutura de proteína aos dados do difração
R_{free}	- Índice residual livre, calculado com 5 a 10% dos dados de reflexão num conjunto a parte que não é utilizado no refinamento
TB	- <i>Terrific broth</i> , meio de cultura enriquecido contendo 12 g L ⁻¹ triptona, 24 g L ⁻¹ extrato de levedura, 0,4% (V/V) glicerol, 2,3 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ e 12,54 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄
TBE	- Tris, borato, EDTA, tampão de corrida para eletroforese de DNA em gel de ágar ou agarose, contendo uma mistura de 89 mmol L ⁻¹ Tris, 89 mmol L ⁻¹ ácido bórico e 2 mmol L ⁻¹ EDTA, pH 8,0
THF	- Tetrahidrofurano
TLS	- Translação-libração-parafuso <i>Translation-libration-screw</i>
Tris	- Tris(hidroximetil)aminometano (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
Top10	- estirpe Top10 de <i>Escherichia coli</i>
SCGA	- Designação da Biblioteca Metagenômica utilizada (Solo Contaminado com Gordura Animal)
Sm	- Estreptomicina
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

GLOSSÁRIO

Accurel - Polipropileno em pó

Amplificação - Geração de múltiplas cópias de DNA a partir da PCR

Chaperonas - Proteínas que auxiliam no enovelamento protéico de outras proteínas

Cela Unitária - Bloco sólido cujo vértices correspondem a três translocações do retículo cristalino que definem o cristal tridimensionalmente

Códons - Sequências de nucleotídeos que codificam um resíduo de aminoácidos

Contig - Sequências-consenso. Sequência de DNA reconstruída a partir de um conjunto de segmentos de DNA sobrepostos

Co-expressão - Expressão conjunta de dois genes dentro de um organismo

Completeza (cristalografia) - Número de reflexões únicas medidas pelo número total de reflexões únicas

Foldases - Chaperona específica a lipases

PCR - Método de amplificação (de geração de múltiplas cópias) de DNA sem o uso de um organismo vivo (bactéria, por exemplo, *E.coli*)

Mini-prep - Mini-preparação (*MINIPREP*) de plasmídeo bacteriano carregador de gene clonado ou extração de DNA plasmidial

N-truncado - Diz-se do gene codificador da proteína que sofreu deleção dos primeiros resíduos da região N-terminal

Primers - Segmentos pequenos de ácidos nucléicos, complementares às extremidades da região de DNA que se pretende amplificar

Quimera - Molécula de DNA recombinante formada por fragmentos de DNA de mais de um organismo.

Reflexões únicas (cristalografia) - Reflexões necessárias para gerar um conjunto completo de reflexões pelas operações de simetria

Reflexões observadas - Número total de reflexões observadas no experimento

Redundância ou multiplicidade - Definida como o número total de intensidades medidas dividido pelo número total de reflexões únicas medidas

RESUMO

Esta tese reporta o trabalho realizado com duas lipases obtidas de uma biblioteca metagenômica, isto é, a clonagem, expressão, purificação e caracterização de uma nova lipase denominada LipC6G9 e a cristalização e determinação da estrutura cristalográfica da lipase LipC12. O gene da lipase LipC6G9 (*lipC6G9*) foi localizado juntamente com o gene de sua foldase, *lifC6G9*. LipC6G9 e LifC6G9 apresentam 96% e 77% de identidade, respectivamente, com as proteínas correspondentes de *Aeromonas veronii* B565. LipC6G9 e LifC6G9 foram co-expressas, ambas na forma N-truncadas, em *Escherichia coli* BL21 (DE3) usando os vetores pET28a(+) e pT7-7, respectivamente, e então purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺ HisTrap™ Chelating HP. A enzima purificada foi eluída da coluna complexada com a sua foldase (Lip-LifC6G9). As características bioquímicas e cinéticas deste complexo foram investigadas. As massas moleculares das proteínas N-truncadas são 32 kDa para LipC6G9 (incluindo a cauda com seis resíduos His) e 23 kDa para sua LifC6G9. Lip-LifC6G9 foi ativa em uma ampla faixa de pH (6,5-10,5) e temperatura (10-40 °C), sendo a maior atividade (1500 U mg⁻¹) apresentada em pH 7,5 e 30 °C. A análise filogenética de LipC6G9 classificou-a como pertencente à subfamília I.1. A análise da sequência com outras lipases bacterianas do *Protein Data Bank* mostraram que LipC6G9 apresenta a tríade catalítica (Ser⁹⁹, Asp²⁴⁶, His²⁶⁸) com o pentapeptídeo conservado Gly-His-Ser-His-Gly (onde Ser é a serina catalítica), uma ponte dissulfeto e um sítio de ligação do íon cálcio conservados. Lip-LifC6G9 possui altas atividades específicas contra os substratos tributirina, tricaprilina e trioleína (1852, 1566 e 817 U mg⁻¹, respectivamente). Estudos de imobilização do complexo no suporte hidrofóbico Accurel MP-1000 mostraram que a melhor concentração de proteína foi 5 mg/g (proteína/ suporte), com tempo de contato de 24 h, com uma eficiência de 68%. A atividade de hidrólise contra trioleína em *n*-heptano para o preparado imobilizado foi 219 ± 28 U g⁻¹, obtendo-se um aumento de 248% após imobilização. Quando Lip-LifC6G9 imobilizada foi incubada a 30 °C em solventes orgânicos puros apresentou-se mais estável em *n*-heptano e em isopropanol. A imobilização não conduziu a um aumento da estabilidade térmica relativamente à enzima livre. Em reações de esterificação com ácido oléico e etanol, em presença de cossolventes (*n*-hexano e *n*-heptano), Lip-LifC6G9 imobilizada apresentou uma conversão de 95% em 6 h, com uma atividade de esterificação de 36 U g⁻¹. As altas atividade e estabilidade de Lip-LifC6G9 livre e imobilizada sugerem que ela tem um bom potencial para uso em biocatálise e em reações de síntese orgânica. No caso da elucidação da estrutura tridimensional de LipC12, que também pertence a subfamília I.1, o cristal coletado com 2,64 Å de resolução pertence ao grupo espacial tetragonal, com parâmetros de cela *a* = *b* = 58,62, *c* = 192,60 Å e valores de *R* = 19,6% e *R*_{free} = 25,4%. Esta é a primeira vez que a estrutura de uma lipase obtida pela abordagem metagenômica foi determinada. Este conhecimento proverá a base para aplicação de técnicas de engenharia genética, que podem viabilizar a obtenção e modificação LipC12 com características melhoradas para o uso em biocatálise.

Palavras-chave: Lipases. Esterases. Foldase. Metagenômica. Estrutura tridimensional. Biocatálise.

ABSTRACT

This thesis reports on work undertaken with two lipases obtained from a metagenomic library, namely the cloning, purification and characterization of a new lipase denominated LipC6G9 and the determination of the crystallographic structure of lipase LipC12. Within the library, the gene *lipC6G9* was cloned jointly with the gene for the foldase, *lifC6G9*. LipC6G9 and LifC6G9 have 96% e 77% identity, respectively, with the corresponding proteins of *Aeromonas veronii* B565. LipC6G9 and LifC6G9 were co-expressed, both in N-truncated form, in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using the vectors pET28a(+) and pT7-7, respectively, and then purified by affinity chromatography using an Ni²⁺ column HisTrap™ Chelating HP. The purified enzyme eluted from the column complexed with the foldase (Lip-LifC6G9). The biochemical and kinetic characteristics of this complex were investigated. The molecular masses of the N-truncated proteins were 32 kDa for LipC6G9 (including the N-terminal His-tag with 6 residues) and 23 kDa for LifC6G9. Lip-LifC6G9 was active over a wide range of pH values (6.5-10.5) and temperatures (10-40 °C), with the highest activity (1500 U mg⁻¹) being obtained at pH 7.5 and 30 °C. A phylogenetic analysis placed LipC6G9 in the lipase subfamily I.1. Comparison of the sequence of LipC6G9 with those of other bacterial lipases in the *Protein Data Bank* showed that LipC6G9 contains the classic catalytic triad (Ser⁹⁹, Asp²⁴⁶, His²⁶⁸) with the catalytic Ser occurring within a conserved pentapeptide (Gly-His-Ser-His-Gly), a conserved disulfide bridge and a conserved calcium binding site. Lip-LifC6G9 has high specific activities against tributyrin, tricaprylin and triolein (1852, 1566 and 817 U mg⁻¹, respectively). Studies of the immobilization of the complex on the hydrophobic support Accurel MP-1000 showed that the best protein concentration was 5 mg/g (protein/support), with a contact time of 24 h, with an efficiency of immobilization of 68%. The hydrolytic activity against triolein in *n*-heptane of the immobilized preparation was 219 ± 28 U g⁻¹, 248% higher than that obtained before immobilization. When immobilized Lip-LifC6G9 was incubated at 30°C in pure organic solvents, it was most stable in *n*-heptane and in isopropanol. Immobilization did not lead to an increase in thermal stability relative to the free enzyme. For the esterification of oleic acid with ethanol, in the presence of co-solvent (*n*-hexane or *n*-heptane), immobilized Lip-LifC6G9 gave a conversion of 95% in 6 h, with a specific esterification activity of 36 U g⁻¹. The high activity and stability of free and immobilized Lip-LifC6G9 suggest that it has a good potential for use in biocatalysis and organic synthesis reactions. In the case of the elucidation of the three dimensional structure of LipC12, which also belongs to lipase subfamily I.1, com 46% de identidade com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* PAL, the crystal collected to 2.70 Å resolution belongs the tetragonal space group P4₁22, with unit cell parameters a = b = 58.62, c = 192.60 Å, values of R = 19.6% e R_{free} = 25.4%. This is the first time that the structure of a lipase obtained through a metagenomic approach has been determined. This knowledge provides the basis for the application of protein engineering techniques aimed at obtaining a modified LipC12 with improved characteristics for use in biocatalysis.

Keyword: Lipases. Esterases. Foldase. Metagenomic. Three-dimensional structure. Biocatalysis.

1. INTRODUÇÃO

Lipases têm aplicação nos mais diversos ramos industriais, desde a indústria de detergentes, de cosméticos, alimentos (síntese de aromas, modificação de óleos e gorduras, flavorizantes), fármacos (obtenção de intermediários de síntese ou compostos quirais), biocombustíveis (síntese de ésteres do biodiesel) e até no tratamento de efluentes. Devido à versatilidade de lipases em diversas aplicações, têm-se buscado cada vez mais obter novas e melhores enzimas capazes de se adaptarem às condições não convencionais utilizadas em biocatálise, como a utilização de solventes orgânicos como meios reacionais.

Diversas abordagens têm sido utilizadas para encontrar lipases que tenham mais atividade e estabilidade nos meios reacionais utilizados em biocatálise, e dentre elas se encontram a prospecção de novas enzimas na biodiversidade, que envolvem técnicas tradicionais de isolamento e cultivo, e técnicas mais modernas, baseadas na metagenômica. Tradicionalmente, a obtenção de novas enzimas tem sido realizada através do isolamento e cultivo de microrganismos, porém, essa técnica apresenta limitações, pois apenas 1% dos microrganismos existentes na biodiversidade são cultiváveis.

A metagenômica pode superar essa limitação, uma vez que o DNA é extraído diretamente de uma amostra ambiental, como solos, sem a necessidade de isolamento e cultivo, aumentando, portanto, as chances de obtenção de novas e melhores enzimas, com características desejáveis para aplicação em biocatálise. Entretanto, apesar das vantagens da abordagem metagenômica, esta técnica apresenta alguns problemas, principalmente relacionados à expressão de proteínas em hospedeiros heterólogos, que pode resultar na formação de corpos de inclusão e na obtenção de uma enzima inativa. No caso de lipases, muitas famílias de lipases bacterianas (I.1 e I.2, segundo classificação feita por ARPIGNY e JAEGER, 1999) apresentam um mecanismo de secreção que necessita de uma chaperona ou foldase, denominada de Lif, que auxilie no seu dobramento correto, pois sem ela a lipase pode apresentar-se inativa. A inativação é neste caso explicada pela formação de corpos de inclusão, que, para algumas famílias de lipases, pode estar diretamente relacionada à ausência da expressão de genes de foldases associados a genes de lipases. Portanto, para lipases que necessitem de foldases, se na abordagem metagenômica o gene

auxiliar (foldase) não for encontrado, isto pode resultar no insucesso da clonagem e expressão da enzima ativa. Muitas abordagens têm sido utilizadas para minimizar a formação de corpos de inclusão, como enovelamento *in vitro* e *in vivo* de lipases por foldases, mas este é um assunto que necessita de muitos estudos.

Além da prospecção por novas enzimas para aplicação em biocatálise, uma outra abordagem é o melhoramento das propriedades de enzimas já conhecidas, o que pode ser propiciado pelo conhecimento de suas estruturas tridimensionais, que gera informações importantes, e que permitem, através da engenharia de proteínas e de técnicas de biologia molecular como a mutação sítio dirigida, o melhoramento das propriedades enzimáticas.

Assim, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar molecular e estruturalmente novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com vistas à utilização em biocatálise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LIPASES

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) e esterases (carboxil éster hidrolases, EC 3.1.1.1) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster (FIGURA 1), hidrolisando-as em ambiente aquoso ou promovendo a sua síntese em ambientes aquo-restritos (em solventes orgânicos) (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER *et al.* 1994).

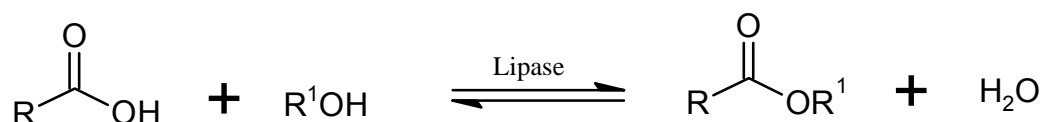


FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR ESTERASES E LIPASES.

A definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster.

A diferenciação entre lipases e esterases não é muito simples, e ainda é assunto de controvérsia. Segundo Sarda e Desnuelle (1958), as lipases são definidas pela propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água (ativação interfacial), ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Por outro lado, as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (JAEGER *et al.* 1994).

Entretanto, como nem todas lipases apresentam o fenômeno de ativação interfacial, estas têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia carbônica com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis de ácidos graxos de cadeia curta, com cadeia com menos de dez átomos de carbono, são reconhecidas como esterases (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER *et al.* 1994). É importante salientar que, como estas duas enzimas possuem características similares em

termos de mecanismo de ação e tipos de substratos, são igualmente importantes em biocatálise.

2.2 MECANISMO CATALÍTICO

O mecanismo catalítico para a hidrólise de um éster por lipases (FIGURA 2) segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma protease, devido à semelhança estrutural dos seus sítios ativos (JAEGER *et al.* 1994). O sítio ativo é composto pelos resíduos His, Ser e Asp, contendo os grupamentos imidazólico da histidina, hidroxila da serina e carboxila do ácido aspártico. Os resíduos da tríade catalítica trabalham juntos na ação de transferência de um grupo acil para serina. Algumas lipases apresentam uma tampa hidrofóbica, denominada de *lid*, que recobre o sítio ativo da enzima e que, ao interagir com a interface lipídeo/água, sofre uma mudança conformacional expondo-o. Lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B apresentam a tampa *lid* (JAEGER; DIJKSTRA e REETZ, 1999); outras lipases, entretanto, podem não apresentá-la, como lipases de *Bacillus*. A *lid* por muito tempo foi associada ao fenômeno de ativação interfacial em lipases (BRADY *et al.* 1990), entretanto, sabe-se que o fato das lipases apresentarem ou não *lid* não interfere em sua atividade hidrolítica e que a “tampa” não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial. As cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER e SCHRAG, 1997).

A histidina presente em algumas lipases na “tampa hidrofóbica” (*lid*) aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio ativo catalítico. O oxigênio da hidroxila serínica provoca um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico expulsa o íon alcóxido ($-OR'$). Na solvólise, este grupo alcóxido ou acil é transferido para o solvente, enquanto na acilação, é transferido para o substrato. A partir da transferência de um próton do resíduo histidina, o álcool, é formado. Na hidrólise, a água ataca novamente o carbono carbonílico ao mesmo tempo que é desprotonada pelo resíduo histidina, originando outro intermediário tetraédrico (acil enzima) (não representado na FIGURA 2). Este

complexo por sua vez libera o ácido carboxílico e a enzima é regenerada (JAEGER; DIJKSTRA e REETZ, 1999).

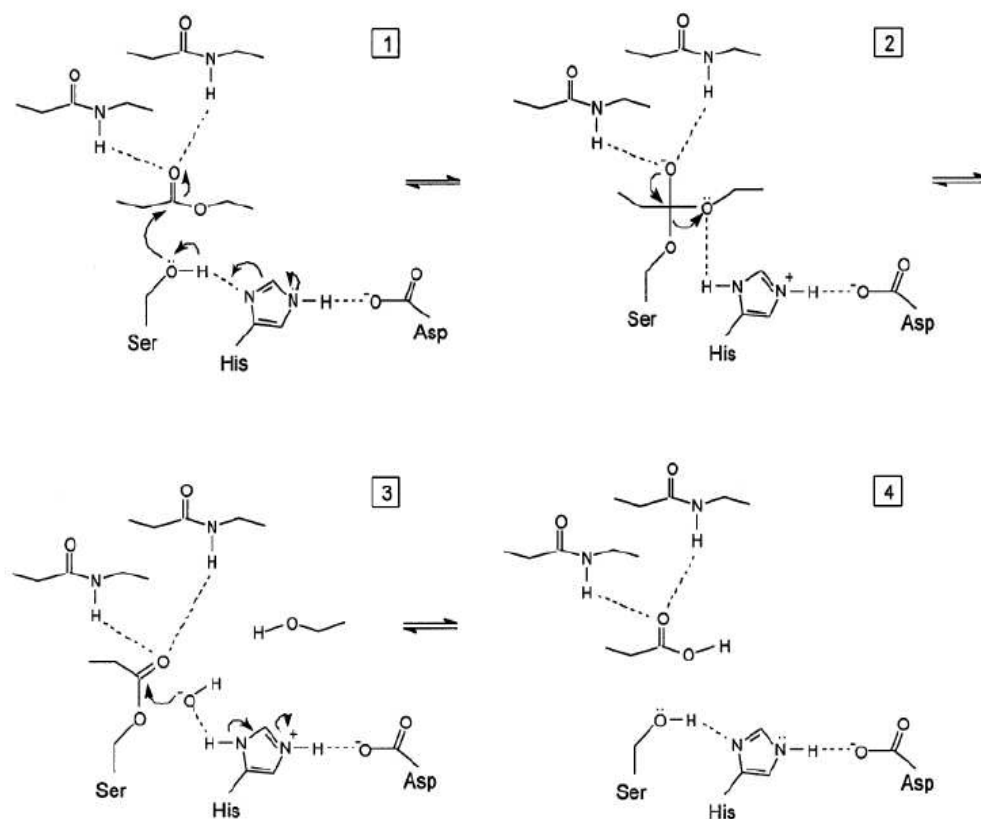


FIGURA 2 - MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES.

Triade catalítica (histidina, serina e aspartato). Fonte: (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.1.2 Estruturas Tridimensionais de Lipases

O conhecimento da estrutura tridimensional (espacial) de enzimas é elemento fundamental no entendimento de suas propriedades. Em particular, no caso de lipases, a determinação das estruturas tridimensionais pode ser a chave do entendimento de suas funções, sendo um guia para a engenharia de proteínas, a fim de desenvolver um biocatalisador mais eficiente e para fazer uso mais preciso de suas especificidades estruturais únicas, inclusive para o melhoramento de suas propriedades catalíticas (MALA e TAKEUCHI, 2008).

Estudos de raios X mostraram que as lipases apresentam em suas estruturas um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas alternadas (JAEGER *et al.* 1994). O resíduo serina da triade catalítica se encontra em um

pentapeptídeo conservado Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly, onde Xaa pode ser um resíduo qualquer. Variações dessa estrutura incluem a substituição do primeiro resíduo de Gly por uma Ala, comum em lipases de *Bacillus*, ou a reestruturação completa do sítio ativo, com a serina catalítica fazendo parte do motivo GDSL, isto é, Gly-Asp-Ser-Leu (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY *et al.* 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al.* 1997) e da lipase pancreática humana (WINKLER e GUBERNATOR, 1994) propiciaram a verificação em nível molecular da existência da tampa hidrofóbica *lid*, anteriormente associada ao fenômeno da ativação interfacial, isto é, acreditava-se que na presença de substratos micelares ou anfipáticos, a *lid* sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo e na presença de substratos solúveis em água ela se manteria fechada, o que explicaria a ausência de atividade das lipases nestes casos (JAEGER *et al.* 1994). A FIGURA 3 ilustra um modelo baseado por homologia de uma lipase com a tampa hidrofóbica aberta e fechada.

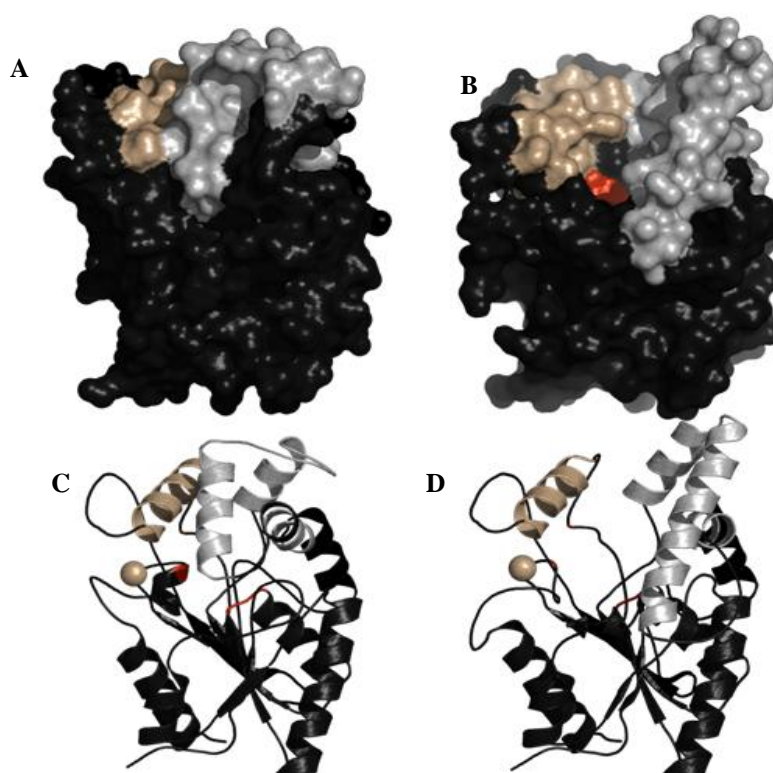


FIGURA 3 - MODELO POR HOMOLOGIA DA LIPASE LipC12 COM A TAMPA HIDROFÓBICA (*LID*) REPRESENTADA NA COR CINZA

FONTE: GLOGAUER (2011). Em **a** e **c** modelos de fitas e superfície com a *lid* fechada. Em **b** e **d** modelos de fitas e superfície com a *lid* aberta. A esfera a esquerda ilustra o íon cálcio na sua possível localização na estrutura. Figuras produzidas no programa Pymol (DeLano, 2002).

Muitas estruturas tridimensionais de lipases têm sido determinadas por cristalografia de raios X, como mostrado na TABELA 1.

TABELA 1 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE LIPASES DETERMINADAS POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X

Estruturas de Lipases Depositadas no PDB	Código Protein Data Bank (PDB)	Referência
I.3 <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38 (PML)	3A6Z	ANGKAWIDJAJA <i>et al.</i> (2010)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2ZYH, 2ZYI, 2ZYR, 2ZYS	CHEN <i>et al.</i> (2009)
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	3ICV, 3ICW	QIAN <i>et al.</i> (2009)
	1LBT, 1TCA, 1TCB, TCC	HORTON <i>et al.</i> (2009)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	2W22	UPPENBERG <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus subtilis</i>	3D2A	CARRASCO-LOPEZ <i>et al.</i> (2009)
Lipase A de <i>Candida antarctica</i>	3GUU, 2VEO	AHMAD <i>et al.</i> (2009)
<i>Burkholderia glumae</i> com sua foldase	2ES4	ERICSSON <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1EX9	PAUWELS <i>et al.</i> (2006)
<i>Burkholderia cepacia</i>	3LIP	NARDINI <i>et al.</i> (2000)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	1QGE	SCHRAG <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas glumae</i>		LANG <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida rugosa</i>	1LPM	CLEASBY <i>et al.</i> (1992)
	1LPN, 1LPO,	CYGLER <i>et al.</i> (1997)
	1LPP	GROCHULSKI <i>et al.</i> (1994)
	1GZ7	GROCHULSKI <i>et al.</i> (1993)
	3RAR	MANCHENO <i>et al.</i> (2003)
Pâncreas de cavalo	1HPL	COLTON (2011)
Pâncreas humano	2PPL,	BOURNE <i>et al.</i> (1994)
	2OXE	WINKLER e GUBERNATOR (1994)
<i>Penicillium camemberti</i>	1TIA	EYDOUX <i>et al.</i> (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1TIB	DEREWENDA <i>et al.</i> (1994)
<i>Rhizopus oryzae</i>	1TIC	DEREWENDA <i>et al.</i> (1994)
<i>Galactomyces geotrichum</i>	1THG	DEREWENDA <i>et al.</i> (1994)
<i>Mucor miehei</i>	5TGL,	SCHRAG e CYGLER (1993)
	1TGL, 3TGL	BRZOZOWSKI <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhizomucor miehei</i>	5TGL	BRADY <i>et al.</i> (1990)
		BRADY <i>et al.</i> (1990)
		BRZOZOWSKI <i>et al.</i> (1991,1992)

Além das lipases apresentadas na TABELA 1, que tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas, duas estruturas de novas esterases de metagenômica também foram determinadas, designadas EstE7 [código do PDB 3K6K, NAM *et al.* (2010)] e EstE1 [código do PDB 2C7B, BYUN *et al.* (2007)]. Entretanto, até o presente momento nenhuma estrutura de lipase de metagenômica foi determinada.

De um modo geral, as lipases relatadas na TABELA 1, apresentam o dobramento α/β hidrolase, algumas com a tampa hidrofóbica *lid*, cristalizadas na conformação aberta (1EX9), outras em conformação fechada (3LIP, 2ES4, 1QGE, 3ICV), algumas não apresentando a tampa (5TGL, 2W22, 3D2A) ou ainda apresentando duas tampas hidrofóbicas como o caso de (3A6Z). Algumas estruturas depositadas no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) podem estar complexadas com ligantes, seja com seus substratos naturais, como 1EX9, ou ainda com sua própria chaperona auxiliar, como 2ES4. Todo conhecimento gerado através da elucidação estrutural da enzima fornece conhecimentos valiosos, mesmo que sejam apenas pequenas discrepâncias como a mutação de um único resíduo ou mudanças na conformação de um *loop*, pois essas podem caracterizar propriedades catalíticas distintas para enzima. Neste contexto, um trabalho estrutural relevante é o da esterase mutante EstE1 (hiper-termofílica), obtida a partir de biblioteca metagenômica, onde foi estabelecida a relação estrutura/função, sugerindo que as interações intermoleculares hidrofóbicas de sua estrutura são essenciais para sua hiper-termoestabilidade. O autor salienta ainda que o entendimento do mecanismo molecular, através da cristalografia de raios X, que permite que EstE1 resista à alta temperatura, poderá fornecer dados para o desenvolvimento racional de esterases/lipases termoestáveis, usando as enzimas lipolíticas que exibem semelhança estrutural com EstE1 (BYUN *et al.* 2007).

2.1.3 Famílias de Lipases Bacterianas

A fim de abranger um entendimento maior sobre lipases bacterianas, elas foram analisadas filogeneticamente e classificadas em oito diferentes famílias com base na identidade e em propriedades bioquímicas, segundo ARPIGNY e JAEGER (1999). A TABELA 2 traz um resumo das propriedades referentes às famílias de lipases. A Família I é a mais ampla e é composta por seis subfamílias. As subfamílias I.1 e I.2 incluem as lipases de *P. aeruginosa* e *B. glumae*, respectivamente. Algumas lipases destas subfamílias são secretadas pelo sistema de secreção do tipo 2 ou Sec e dependem de uma chaperona denominada de Lif (*lipase-specific foldase*) (FIGURA 4), enquanto as da família

I.3, que compreendem as lipases de *P. fluorescens* e de *Serratia marcescens* são secretadas pelo sistema de secreção do tipo 1, que utiliza proteínas denominadas transportadores ABC (ANGKAWIDJAJA e KANAYA, 2006).

TABELA 2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE LIPASES BACTERIANAS

Família	Sub-família	Lipases ou Esterases	Propriedades Gerais			
			Foldase (Lif)	Ions Ca^{2+}	Dissulfeto	Características
I	1	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>P. fragi</i> <i>P. wisconsinensis</i>	Sim ou não	Sim	Sim ou não	Sistema de secreção tipo II ou Sec Possuem elevado grau de homologia
		<i>Proteus vulgaris</i> <i>B. glumae</i> <i>C. viscosum</i> <i>B. cepacia</i> <i>P. luteola</i>				
		<i>P. fluorescens</i> SIK W1 <i>Serratia marcescens</i>				
	2		Sim ou não	Sim	Sim	
	3		Não	Sim	Não	Sem peptídeo sinal N-terminal
						Sistema de secreção tipo I
II	4	<i>B. subtilis</i> <i>B. pumilus</i>				Menores lipases conhecidas
	5	<i>B. stearothermophilus</i> <i>B. thermocatenulatus</i> <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>				A primeira glicina do pentapeptídeo conservado é substituída por uma alanina. Pode apresentar uma chaperona intramolecular que facilita a translocação da lipase para fora da célula
	6	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptomyces cinnamomeus</i>				
		<i>A. hydrophila</i> <i>S. scabies</i> <i>P. aeruginosa</i>				-Faz parte do motivo GDSL
		<i>S. exfoliates</i> <i>Streptomyces albus</i>				-Dobramento α/β hidrolase regular
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> <i>Pseudomonas</i> sp. B11-1 <i>Archaeoglobus fulgidus</i> <i>Escherichia coli</i>				Lipases sensíveis a hormônios (HSL) de mamíferos
		<i>P. oleovorans</i> <i>Haemophilus influenzae</i>				Similar a outras enzimas não lipolíticas
		<i>Synechocystis</i> sp. <i>Spirulina platensis</i> <i>P. fluorescens</i>				Semelhantes à fosfolipase de mamíferos
		<i>Arthrobacter oxydans</i> <i>B. subtilis</i>				Semelhantes à acetilcolinesterase de eucariotos
		<i>Arthrobacter globiformis</i> <i>S. chrysomallus</i>				Semelhantes a β -lactamases

Fonte: ARPIGNY e JAEGER (1999)

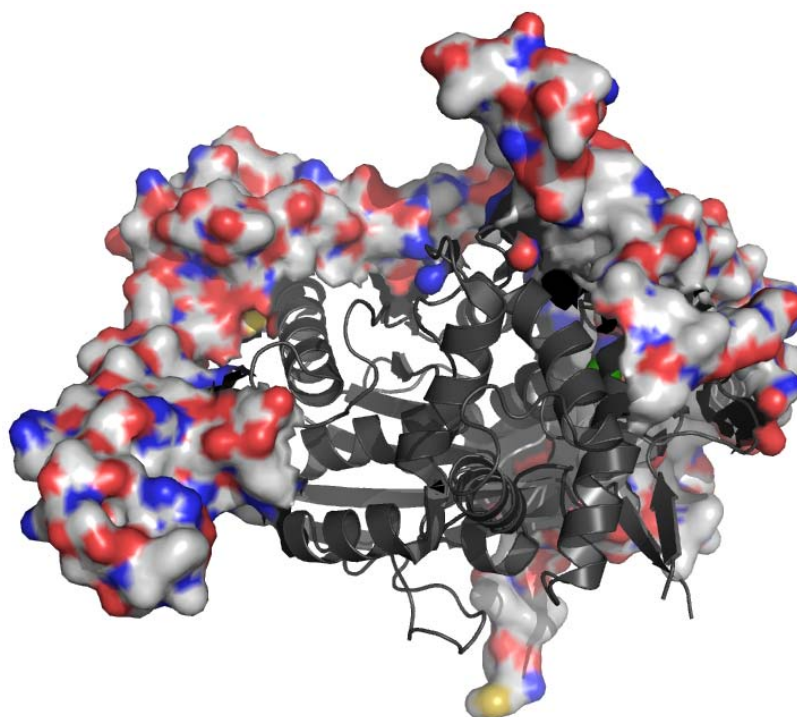


FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Burkholderia glumae* COMPLEXADA COM SUA FOLDASE.

Em cinza claro (modelo de superfície) a estrutura da foldase e em cinza escuro (modelo de fitas) a lipase. Fonte: PAUWELS *et al.* (2006). Figura produzida no programa PyMol (DeLano, 2002).

As lipases das subfamílias I.1 e I.2 podem ligar íons Ca^{2+} através de dois resíduos conservados de aspartato e ainda podem conter uma ponte dissulfeto formada por duas cisteínas. Essas lipases geralmente apresentam consideráveis diferenças de enantiosseletividade e regiosseletividade, apesar do elevado grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos (CHEN *et al.* 2009). A subfamília I.4 compreende as lipases de *Bacillus*, enquanto que lipases caracterizadas como termofílicas foram agrupadas na subfamília I.5. A família II de lipases compreende aquelas enzimas onde a serina catalítica faz parte do motivo GDSL e as lipases da família III apresentam um dobramento α/β hidrolase canônico; a família IV apresenta grande semelhança com lipases sensíveis a hormônios (HSL) de mamíferos. As lipases agrupadas na família V são originadas de organismos mesofílicos, termofílicos e psicrófilos e apresentam similaridade com outras enzimas não lipolíticas. As famílias VI e VII são formadas por lipases semelhantes à fosfolipase e à acetilcolinesterase eucariótica, respectivamente. Por fim, a família VIII compreende as lipases semelhantes a β -lactamases. Novas enzimas lipolíticas têm sido isoladas identificadas de metagenômica de vários

ambientes, e novas famílias têm sido propostas, devido à sua baixa similaridade com as seqüências existentes, ou ainda a algumas características incomuns em lipases bacterianas (KIM *et al.* 2010; LEE *et al.* 2006).

2.2. APLICAÇÕES DE LIPASES EM BIOCATÁLISE

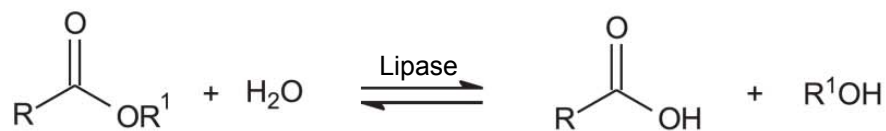
A utilização de lipases como catalisadores em reações sintéticas em meio orgânico não é recente, pois os primeiros relatos são do início do século XX. Após a publicação dos trabalhos de Zaks e Klivanov, ressurgiu o interesse por esses biocatalisadores (ZAKS e KLIBANOV, 1988a; ZAKS e KLIBANOV, 1988b; ZAKS e KLIBANOV, 1985; ZAKS e KLIBANOV, 1984). Nesta época, na década de 1980, acreditava-se que as lipases tinham pouca utilidade em síntese orgânica porque se supunha que mantinham suas estruturas cataliticamente ativas somente em meios aquosos. Entretanto, sabe-se que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos até superior. Esta característica deve-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos, à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também, ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares (KLIBANOV, 2001).

As enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e esterases) são as mais freqüentemente usadas na química orgânica. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa comparadas aos catalisadores químicos, pode-se citar ampla disponibilidade, a atuação em condições brandas, biodegradabilidade, a facilidade de uso, porque não necessitam de cofatores, a alta seletividade e a capacidade de atuação em solventes orgânicos (FORESTI e FERREIRA, 2005; FABER, 1997).

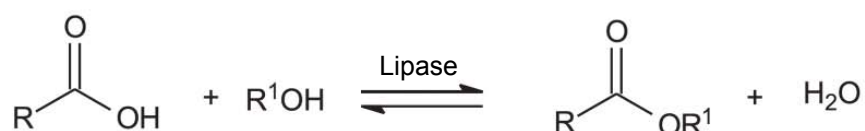
A utilização e o interesse por lipases como biocatalisadores (TABELA 3) advêm da capacidade de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso, reações de hidrólise, como em meio orgânico, com teor de água restrito, como reações de esterificação, transesterificação (alcoólise, acidólise), interesterificação, aminólise (síntese de amidas), tiotransesterificação e lactonização (CARVALHO *et al.* 2005; KRIEGER *et al.* 2004; VILLENEUVE *et al.*

2000; JAEGER; REETZ, 1998). A FIGURA 5 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

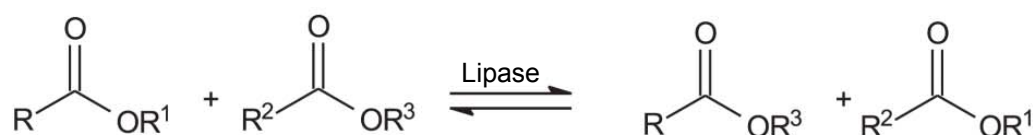
Hidrólise



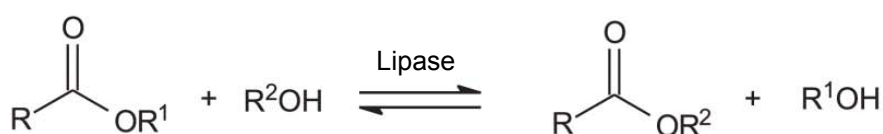
Esterificação



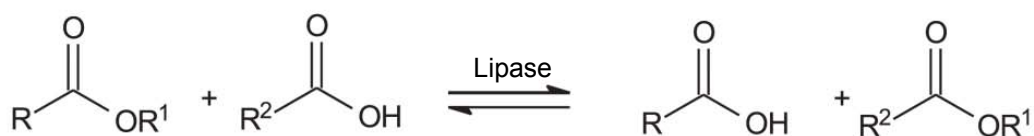
Interesterificação



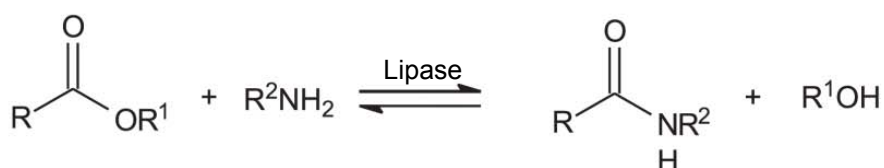
Alcôólise



Acidólise



Aminólise



Lactonização

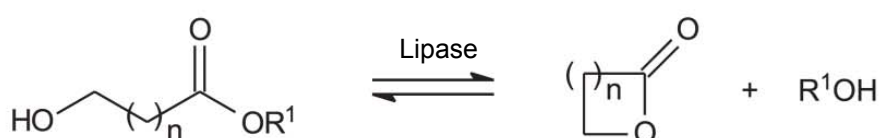


FIGURA 5 – REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Além disso, lipases mostram elevadas regioseletividade e estereoseletividade (alta seletividade), o que as torna atrativas à biocatálise para a produção de compostos opticamente puros em síntese química (CARRASCO-LOPEZ *et al.* 2009; CAREY; SUNDERBERG, 2008; HASAN, 2006; GOTOR *et al.* 2006). Uma importante aplicação das lipases é na resolução de álcoois quirais e ésteres pela acilação ou hidrólise, respectivamente (JAEGER e EGGERT, 2002, JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

Novas metodologias em síntese orgânica têm sido desenvolvidas usando a catálise enzimática a fim se utilizar uma maneira mais ecológica para obter ingredientes flavorizantes ou fragrâncias. Tem sido reportado o uso de lipases para a transferência do grupo acil para álcoois, aminas e hidrogênio para hidroperóxidos. As lipases têm sido usadas para a hidrólise de tioésteres, por exemplo, para a síntese dos derivados de 3-mercaptop-hexil, 2-metil-3-furantiol e 2-furfuriltiol (DIA *et al.* 2010).

Recentemente, a indústria farmacêutica tem produzido compostos opticamente puros, em detrimento da produção das misturas racêmicas, que por sua vez apresentam uma série de implicações indesejáveis, como ocorrência de vários efeitos colaterais. Muitos fármacos sintetizados possuem um ou mais estereocentros, que são geralmente comercializados como uma mistura racêmica (JAEGER, EGGERT, 2002; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999), porém a atividade biológica de um composto depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente, um dos isômeros (*R* ou *S*) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico. Uma forma de obter fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza enantiomérica é através de biocatalisadores enzimáticos, capazes de reconhecer moléculas quirais e atuarem preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. Um exemplo da utilização da lipase para obtenção do enantiômero puro foi realizado por CARVALHO *et al.* (2005), para a obtenção do enantiômero (*S*)- ibuprofeno, forma 160 vezes mais ativa do que a forma (*R*) (FIGURA 6). Este foi obtido a partir da reação de esterificação do racemato ibuprofeno (nomenclatura IUPAC, ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil] propanóico, fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$). Geralmente, o produto opticamente puro tem um alto valor agregado, maior que a mistura

racêmica, entretanto a produção pode ser limitada por dificuldades legais e do processo (CARVALHO *et al.* 2005).

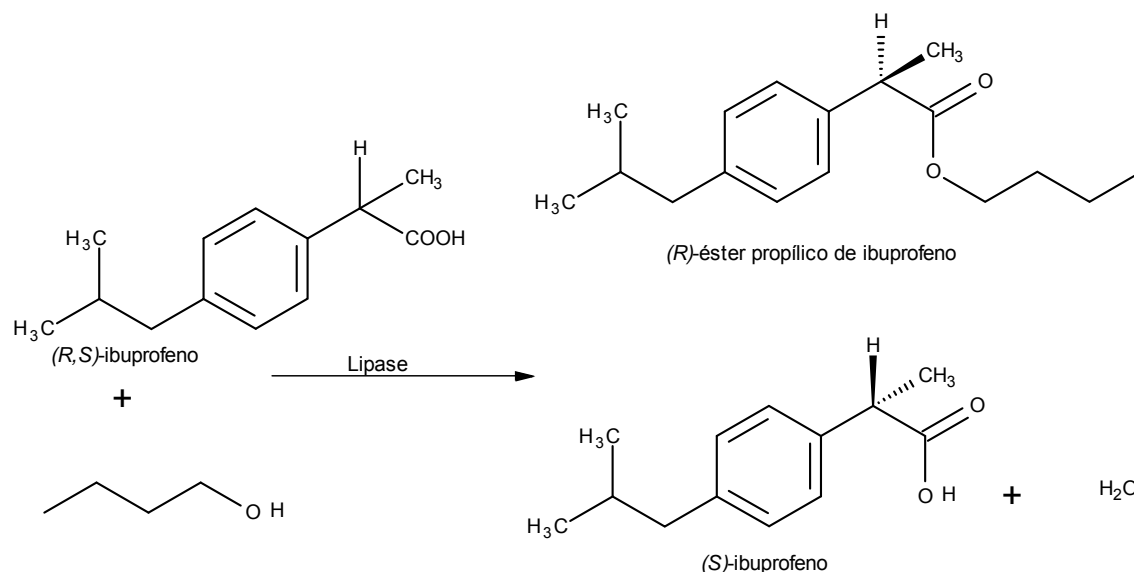


FIGURA 6 - OBTENÇÃO DO (S)- IBUPROFENO

Uma forma bastante simples de obter a forma (S)-ativa presente na mistura racêmica do fármaco é realizar a reação de esterificação utilizando lipase que apresente enantiosseletividade para a forma (R)-ibuprofeno. Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (R)-éster, discriminando o (S)-ibuprofeno da mistura racêmica, conforme ilustrado. Posteriormente, o ácido discriminado, (S)-ibuprofeno, pode ser separado do meio de reação reagindo-o com uma base forte em meio aquoso. Fonte: CARVALHO *et al.* (2005).

Apesar dos inúmeros exemplos de aplicações das lipases relatadas em escala laboratorial (TABELA 3), ainda existem problemas para serem resolvidos no desenvolvimento de processos de aplicações, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção, purificação e imobilização das enzimas torna os processos enzimáticos mais caros do que os processos químicos, como no caso da produção do biodiesel, por exemplo. Além disso, a existência de enzimas com propriedades requeridas no processo, como atividade e estabilidade em condições consideradas não-naturais, é sempre limitada, e muitas vezes propiciada apenas pela criação de novas enzimas por técnicas de biologia molecular (KRIEGER *et al.* 2004, ARNOLD, 2001). Portanto, a procura por enzimas que sejam capazes de se adaptar a condições não convencionais de biocatálise, como por exemplo, presença de solventes orgânicos e quase ausência de água livre, é cada vez maior, pois estes são os sistemas reacionais mais utilizados em síntese química. A prospecção de novas lipases capazes de se adaptarem a condições não-convencionais de biocatálise pode ser realizada através da abordagem metagenômica, como relatado a seguir.

TABELA 3 – EXEMPLOS DE EMPREGO DAS LIPASES EM DIVERSAS REAÇÕES

Aplicações	Referências
Síntese enantiosseletiva	LARISSEGGER-SCHNELL <i>et al.</i> (2006) MAJEWSKA <i>et al.</i> (2006) NAIK <i>et al.</i> (2010) SKOURIDOU <i>et al.</i> (2004)
Resolução de drogas quirais, como por exemplo, flurbiprofeno, naproxeno, ibuprofeno, cetoprofeno Síntese de ésteres de aroma	SHARMA, SHARMA e SHUKLA (2011) KUMAR <i>et al.</i> (2005) FERNANDES <i>et al.</i> (2004) ABBAS e COMEAU (2003)
Síntese de fármacos	ELEND <i>et al.</i> (2006) BEVILAQUA <i>et al.</i> (2004) LOZANO <i>et al.</i> (2004)
Síntese de ésteres etílicos	BARON <i>et al.</i> (2011) SALUM <i>et al.</i> (2010) SALUM <i>et al.</i> (2008) FERNANDES <i>et al.</i> (2007) SOLIMAN <i>et al.</i> (2007) SALIS <i>et al.</i> (2005) BARON <i>et al.</i> (2005)
Modificação de óleos e gorduras com o objetivo de torná-las mais saudáveis	SHARMA, SHARMA e SHUKLA (2011) SOLIMAN <i>et al.</i> (2007) METZGER e BORNSCHEUER (2006)
Tratamento de efluentes	ALBERTON <i>et al.</i> (2010)
Derramamento de óleo em oceanos e rios e em grandes áreas de terra derivadas da indústria de laticínios e da indústria oleoquímica	ALONSO (2001)
Cosméticos detergentes e fármacos	LORENZETTI (2007) HASAN <i>et al.</i> (2006, 2010)

2.3 PROSPECÇÃO METAGENÔMICA COMO FERRAMENTA PARA OBTENÇÃO DE NOVAS LIPASES

As lipases têm sido isoladas tradicionalmente a partir de uma variedade de plantas, animais e microrganismos (OTTEN, HOLLMANN e ARENDS, 2010, BYUN *et al.* 2007, SOLIMAN *et al.* 2007; RHEE *et al.*, 2005), sendo as lipases microbianas as mais utilizadas em processos biocatalíticos (BÖTTCHER e BORNSCHEUER, 2010).

A descoberta de novos genes microbianos que codificam enzimas valiosas foi por muito tempo dependente do cultivo de microrganismos, através da busca por microrganismos produtores de enzimas na biodiversidade (BOUTAIBA *et al.* 2006, USAMI *et al.* 2003, MARHUENDA-EGEA; BONETE, 2002). Porém, essa técnica apresenta limitações, pois se sabe que apenas uma pequena proporção (cerca de 1%) destes microrganismos podem ser cultivados em laboratório. Isto se deve basicamente às limitações inerentes às técnicas de isolamento e cultivo, uma vez que todos os meios de cultura são seletivos em maior ou menor extensão para os diversos grupos de microrganismos e, na maioria das vezes, são incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente. Este é o caso de microrganismos que vivem sob a forma de consórcios, onde uma espécie depende de produtos do metabolismo de outras espécies para sua sobrevivência e multiplicação (HANDELSMAN 2004; RONDON *et al.* 2000).

A metagenômica (coleção de clones obtidos a partir de fragmentos de DNA coletados em determinados ambientes) pode superar a limitação imposta pelo cultivo de microrganismos, pois envolve técnicas de clonagem direta de DNA de amostras ambientais sem a necessidade de isolamento e cultivo (HANDELSMAN, 2004; RONDON *et al.* 2000). O termo metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman (HANDELSMAN *et al.* 1998) e é definido como “*a aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo em laboratório das espécies individuais*”.

A técnica da metagenômica (FIGURA 7) consiste na seleção e coleta de amostras do ambiente, na extração dos fragmentos de DNA e posterior seqüenciamento e análise; em seguida, por técnicas de engenharia genética, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA circular, com capacidade independente de replicação, denominada DNA recombinante; e finalmente, essas moléculas de DNA são inseridas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, originando uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica. Os clones são submetidos à etapa de *screening* para a propriedade desejada, como produção de antibióticos, biosurfactantes ou enzimas como proteases, celulasas, amilases ou esterases e lipases (SOLIMAN *et al.* 2007; HANDELSMAN *et al.* 1998).

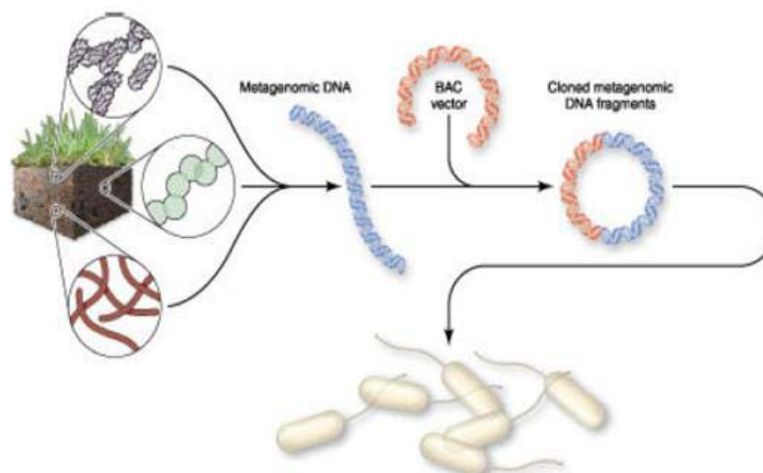


FIGURA 7 - CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

Fragmentos grandes de DNA obtidos de microrganismos não cultivados de solo são ligados em vetores BAC, cosmídeo ou fosmídeo e inseridos em células hospedeiras de *Escherichia coli*.
Fonte: OSBURNE *et al.* (2000).

Através da metagenômica tem-se encontrado cada vez mais novas lipases adequadas para muitas aplicações industriais por apresentarem alta estabilidade em elevadas temperaturas, em solventes orgânicos, em agentes tensoativos (CÔTÉ e SHARECK, 2010, MEILLEUR *et al.* 2009). Estudos de metagenômica permitiram a identificação de uma esterase para a preparação de (S)-cetoprofeno (YOON *et al.* 2007). Embora diversos métodos, tais como a cristalização, a resolução cinética e a separação cromatográfica sejam relatados para a preparação de (S)-cetoprofeno, prefere-se a aplicação de enzimas tais como esterases/lipases em comparação a catalisadores químicos, porque estas apresentam uma alta enantiosseletividade, evitando reações e produtos colaterais. Portanto, encontrar novas esterases ou lipases enantiosseletivas, como por exemplo, para obtenção de (S)-cetoprofeno, enfatiza a importância de bibliotecas metagenômicas como recurso potencial para identificar genes desconhecidos e de elevadas especificidades (YOON *et al.* 2007).

Além disso, lipases estáveis na presença de vários cátions divalentes e alta concentração de sal (NaCl) também foram relatadas (CHU *et al.* 2008). Os genes de esterases e lipases descobertos a partir de bibliotecas metagenômicas podem ser oriundos de vários ambientes, como por exemplo, lama e sedimentos, em água de ambientes térmicos (RHEE *et al.* 2005.), solos contaminados por gordura (GLOGAUER *et al.* 2011; ELEND *et al.* 2007; ELEND *et al.* 2006), solos de

compostagem (LAMMLE *et al.* 2007), sedimentos marinhos (JEON *et al.* 2009a), sedimentos do Ártico (JEON *et al.* 2009b), solos lixiviados (RASHAMUSE *et al.* 2009) e solos de diferentes ecossistemas (FAORO *et al.* 2011; COUTO *et al.* 2010; KIM *et al.* 2010; WEI *et al.* 2009). Apesar disto, só recentemente é que lipases encontradas via metagenômica foram caracterizadas bioquimicamente de forma suficiente para permitir a avaliação da conveniência delas para aplicações biotecnológicas (ELEND *et al.* 2006). A TABELA 4 traz algumas enzimas hidrolíticas descobertas a partir da abordagem metagenômica e suas atividade e preferência por substratos.

TABELA 4 – EXEMPLOS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS OBTIDAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

Lipase	Ambiente	Purificada	Determinação de Atividade	Atividade U mg ⁻¹ ou %	Referência
Sem nome	Obtida de Verenium corporation	Não	Titulométrico	87,2 (C10)	BERTRAM <i>et al.</i> (2008)
RlipE1 e RlipE2	Rúmen bovino	Sim	Titulométrico	346 e 232 (C18)	LIU <i>et al.</i> (2009)
EML1	Sedimentos marinhos	Sim	Espectrofotométrico	203 (C12)	JEON <i>et al.</i> (2009a)
PWTSB e PWTSC	Amostras de solo da China	Sim	Espectrofotométrico	150 e 166 (C16)	WEI <i>et al.</i> (2009)
LipIAF5.2	Biodiversidade do biofilme de um reator	Sim	Espectrofotométrico	70% (C18)	MEILLEUR <i>et al.</i> (2009)
EstMY	Lodo de uma estação de tratamento de esgoto	Sim	Espectrofotométrico	100% (C8)	JUNGANG <i>et al.</i> (2010)
LipA	Sedimento de mangue brasileiro	Não	Espectrofotométrico	0,87 (C10)	COUTO <i>et al.</i> (2010)
LipC12	Solos contaminados por gordura	Sim	Titulométrico	1800 (C18)	GLOGAUER <i>et al.</i> (2011)
EstM-N1 e EstM-N2	Sedimentos do Ártico	Sim	Espectrofotométrico	37,8 e 7,5 (C4)	YU <i>et al.</i> (2011)
Lip018ORF16	Solo de floresta Atlântica (BR)	Sim	Espectrofotométrico	42% (C16) 29%(C18)	FAORO <i>et al.</i> (2011)
Esterase Sys410	Solo da bacia de Turban	Sim	Espectrofotométrico	772,9 (C2)	FAN <i>et al.</i> (2012)

LipC12 (TABELA 4) é uma lipase oriunda de uma biblioteca metagenômica que foi produzida a partir de um solo contaminado com gordura animal. Essa enzima apresentou características bastante distintas comparada a outras lipases de metagenômica, tais como EML1, derivada de uma biblioteca metagenômica de sedimentos marinhos e RlipE1 e RlipE2, isoladas de uma biblioteca derivada de rúmen bovino. LipC12 apresenta elevada atividade específica para triacilgliceróis de ácidos graxos de cadeia longa (p.e; trioleína, azeite de oliva e gordura de porco), aproximadamente 1800 U mg^{-1} (GLOGAUER *et al.* 2011), enquanto EML1 apresenta preferência por triacilgliceróis de cadeia média, com uma atividade de 203 U mg^{-1} para trilaurina (C12) (JEON *et al.* 2009a). RlipE1 e RlipE2 apresentaram atividades específicas menores para o substrato trioleína (C18) comparadas à LipC12 (346 e 232 U mg^{-1} , respectivamente) (LIU *et al.* 2009). Muitos autores de metagenômica definem enzimas hidrolíticas como lipases e reportam apenas halos de hidrólise em meio seletivo com trioleína ou azeite de oliva, porém sem medidas de atividade (ELEND *et al.* 2007), ou com medidas de atividades expressas em porcentagem. Essas características associadas à alta atividade e estabilidade ao pH, solventes orgânicos e concentrações de sal tornam LipC12 uma enzima de metagenômica bastante distinta, dada a sua especificidade e o ambiente que a procedeu, que permite um gama de potenciais aplicações biocatalíticas, o que justificou, no presente trabalho, a determinação da sua estrutura tridimensional.

Apesar de todas as vantagens relatadas do uso da abordagem metagenômica em comparação às técnicas tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos para a obtenção de uma nova enzima, ela apresenta algumas limitações, devido à expressão de proteínas em sistemas heterólogos, tais como a expressão em *E. coli*, organismo comumente usado (LUSSIER *et al.* 2010), pois nestes sistemas as lipases podem ser expressas inativas devido à formação de corpos de inclusão (PARK *et al.* 2007; KIM *et al.* 2004).

A formação de corpos de inclusão está diretamente relacionada a algumas famílias de lipases que apresentam genes de foldases associados, sendo um grande limitante na exploração do potencial biotecnológico dessas enzimas. O gene auxiliar que codifica uma foldase (chaperona específica a lipase, Lif), em algumas famílias de lipases bacterianas, estão no mesmo *operon* que o gene da lipase (WILHELM *et al.* 2007; ROSENAU, TOMMASSEN e JAEGER, 2004;

JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Sem a foldase, a lipase é produzida em uma forma inativa, como relatado para algumas espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* (gram-negativas) (SANGEETHA, ARULPANDI e GEETHA, 2011; ROSENAU, TOMMASSEN E JAEGER, 2004). Para a expressão funcional da lipase muitos trabalhos têm utilizado diferentes abordagens, tais como: uso de aditivos químicos (KOJIMA *et al.* 2003), enovelamento *in vitro* da lipase com a foldase (AKBARI *et al.* 2010; OGINO *et al.* 2008; PUECH-GUENOT *et al.* 2008; OGINO *et al.* 2007; TRAUB *et al.* 2001; QUYEN *et al.* 1999; HOBSON *et al.* 1993), expressão em hospedeiros homólogos (PAUWELS *et al.* 2008, 2005), que é limitada devido a muitas estirpes serem patogênicas (TRAUB *et al.* 2001) e utilização de sistemas de expressões especiais contendo chaperoninas (CUI *et al.* 2011; LIU, SCMID e RUSNAK, 2006) vendidos por Takara (Otsu, Japan).

Uma outra estratégia de reenovelamento das lipases é a co-expressão dos genes *lip* e *lif* (PENG *et al.* 2011; MADAN e MISHRA, 2010; HOBSON *et al.* 1993), quando ambos são conhecidos, e, mesmo assim, podem resultar em uma enzima com baixa atividade. Há ainda que se diferenciar dois tipos diferentes de co-expressões. Primeiramente, pode-se chamar de co-expressão quando em um mesmo plasmídeo são inseridos os genes da lipase e foldase, isto é, uma única seqüência dos genes *lif* e *lip*, porém essa técnica pode resultar numa baixa expressão e baixo rendimento da lipase (PENG *et al.* 2011; HOBSON *et al.* 1993). A estratégia utilizada no presente trabalho é outro tipo de co-expressão, a mesma adotada por MADAN e MISHRA (2010), isto é, o gene da lipase e foldase são clonados em plasmídios diferentes, mas inseridos no mesmo hospedeiro heterólogo. Uma vantagem a ser destacada do redobrimento *in vivo* em relação ao *in vitro* consiste no procedimento de envolver uma única simples etapa, sendo a enzima ativa obtida logo após a expressão.

2.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Do ponto de vista de aplicação biotecnológica, as lipases podem ter suas propriedades catalíticas melhoradas através da imobilização, principalmente para aplicação em meio orgânico, que é o meio reacional utilizado para a maioria das reações de síntese (HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009).

A imobilização, isto é, a ancoragem da enzima em um suporte para posterior reutilização do biocatalisador, é um processo simples e eficiente, o que o torna menos dispendioso (GUISÁN, 2006). As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: facilidade de recuperação do biocatalisador; facilidade de separação dos produtos; processamento contínuo, isto é, permite aplicações em reatores de processos contínuos, que podem operar por muito mais tempo, permitindo sua reutilização sem perda significativa de sua atividade catalítica. Além disso, a imobilização previne a formação de agregados em meio orgânico e minimiza efeitos desnaturantes, por mudanças de pH, e aumenta a estabilidade térmica do biocatalisador (GUISÁN, 2006; LÓPEZ-GALLEGO *et al.* 2005);

A imobilização pode alterar as propriedades físico-químicas através de mudanças conformacionais da enzima aderida ao suporte, aumentando a sua atividade ou estabilidade, mas estas alterações podem também representar uma desvantagem, uma vez que podem alterar desfavoravelmente as propriedades da enzima. Outra desvantagem da utilização de enzimas imobilizadas seria o custo do suporte e a perda de atividade durante o processo de imobilização (ARROYO, 1998, FREIRE *et al.* 1988).

Enzimas podem ser imobilizadas em suportes por processos de adsorção (iônica ou hidrofóbica), por ligação covalente, ligação cruzada (com glutaraldeído), entrelaçamento entre polímeros ou por encapsulamento em géis e micelas (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004; MURTY *et al.* 2002). Para a fixação da enzima em um suporte, devem-se levar em consideração as propriedades finais desejáveis para enzima imobilizada, a fim de selecionar o suporte em conformidade com o meio reacional a ser utilizado (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009; MALCATA *et al.* 1990). As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo (MENDES *et al.* 2012). Os suportes mais utilizados nos processos de adsorção de enzima e classificados de acordo com o material que o compõem, segundo VITOLO (2001) são: inorgânicos (vidro, terra diatomácea, sílica-gel e alumina) e orgânicos, que incluem polímeros sintéticos (polietileno, polipropileno, poliestireno, poliéster acrílico, monômeros de acrílico,

álcool polivinílico e resinas trocadoras de íons); polissacarídeos (agarose, alginato de cálcio e quitina) e agregados enzima-lipídeos. Podem também ser classificados, segundo DALLA-VECCHIA *et al.* (2004), conforme sua morfologia como materiais porosos, não-porosos e de estrutura de gel.

A utilização de suportes porosos é vantajosa porque a enzima pode ser adsorvida no interior dos poros, desde que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. A grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima permite que ela fique protegida dos efeitos de turbulência externos (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004).

Particularmente, no caso de lipases, suportes hidrofóbicos podem promover ativação e melhorar a sua atividade. BASTIDA *et al.* (1998) defendem a hipótese de que suportes porosos com grande superfície interna ativada com grupamentos altamente hidrofóbicos poderiam ser reconhecidos por lipases, em nível molecular, como interface sólida. A FIGURA 8 ilustra uma representação da lipase adsorvida ao suporte hidrofóbico, com a tampa hidrofóbica aberta, onde se observa que as moléculas podem possuir diferentes orientações. Alguns autores propõem que a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos mimetize a ativação interfacial (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009; BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006; MATEO, PALAOMO e FERNANDEZ-LORENTE, 2007; CAO, 2005; FERRER *et al.* 2002; PERSSON *et al.* 2002); isto é, na presença de suportes hidrofóbicos, a lipase abre a tampa para permitir a interação entre sua face hidrofóbica (resíduos hidrofóbicos), que normalmente cercam o sítio ativo, sendo o sítio ativo exposto ao meio reacional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A utilização do suporte hidrofóbico é extremamente interessante porque esse suporte mimetiza o substrato natural das lipases (gotas de óleo) e permite em única etapa de purificação, imobilização e ativação de muitas lipases mesofílicas. Entretanto, quando essa ligação lipase-suporte hidrofóbico é muito intensa, pode ocorrer dificuldade de acesso ao substrato no sítio ativo (efeitos de partição e de difusão) e a proteína pode sofrer rearranjo estrutural (efeitos conformacionais) (BASTIDA *et al.* 1998).

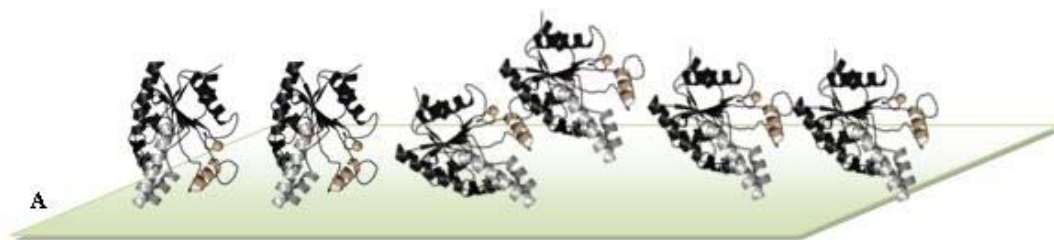


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DA LIPASE ADORVIDA EM SUPORTE HIDROFÓBICO
Fonte: O AUTOR (2012).

Dentre os suportes hidrofóbicos utilizados para imobilização de lipases que promovem a melhora das propriedades enzimáticas está o polipropileno microporoso Accurel. Segundo PENCREAC'H e BARATTI (1999, 1997), uma das principais vantagens da imobilização em Accurel é a ativação e estabilização da enzima em presença de solventes orgânicos apolares, que permitem as moléculas do solvente interagir com a estrutura protéica sem a perda da atividade da enzima. Isso ocorre porque o suporte evita que a água de hidratação seja perdida e desnature a proteína, mantendo a sua estrutura nativa nestes sistemas heterogêneos, o que certamente não ocorreria com a enzima livre. KAEWTHONG *et al.* (2005) comparam cinco suportes (celite, sílica gel, CaCO_3 , Accurel EP100 e carvão ativo) para a imobilização da lipase de *Pseudomonas sp* (LP) e os autores verificaram que o Accurel EP100 foi o melhor, apresentando aproximadamente 37% mais de atividade em relação aos demais suportes. Recentemente, SÉVERAC *et al.* (2011) estudaram a imobilização da lipase de B de *Candida antartica* CalB para utilização no processo de transesterificação de triacilgliceróis em reatores tubulares de leito fixo. Compararam os suportes Accurel e Lewatit VPOC1600 e verificam que, para o Accurel, não houve adsorção de glicerol (produto, gerado na reação), ao suporte, enquanto o suporte comercial Lewatit VPOC1600 adsorveu glicerol e reduziu drasticamente a atividade enzimática, limitando a catálise heterogênea. Esses autores também observaram um aumento na adsorção da enzima imobilizada quando o Accurel MP-1001 foi pré-tratado com acetona em vez de etanol.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi isolar e caracterizar molecular e estruturalmente novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com vistas à utilização em biocatálise.

Os objetivos específicos propostos foram:

- (1) Selecionar clones com atividade lipásica em biblioteca metagenômica utilizando ensaios de triagem em placas com substratos trioleína, tributirina e tricaprilina;
- (2) Selecionar um clone da etapa anterior e seqüenciar o gene identificado;
- (3) Identificar a seqüência de nucleotídeos e, conseqüentemente, a seqüência de aminoácidos da proteína;
- (4) Realizar amplificação e clonagem em vetores de expressão do gene identificado;
- (5) Realizar a expressão heteróloga do clone e purificar a proteína expressa por este clone;
- (6) Caracterizar as propriedades bioquímicas da lipase obtida, pela determinação da massa molecular, do ponto isoelétrico (pI) teórico, e da especificidade da proteína;
- (7) Determinar parâmetros cinéticos da enzima livre, tais como, estabilidade em solventes orgânicos, efeito da temperatura na atividade e estabilidade; efeito do pH na atividade e estabilidade;
- (8) Imobilizar a lipase e testar as propriedades de atividade em meios aquo-restritos (solventes orgânicos), estabilidade em solventes, temperatura e na reação de síntese do éster oleato de etila com cossolvente;
- (9) Cristalizar e determinar a estrutura cristalográfica de uma nova lipase LipC12 obtida por prospecção metagenômica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DO TRABALHO

O fluxograma apresentado na FIGURA 9 contém a estratégia e uma visão geral do trabalho e está dividido em três partes: a primeira se refere à purificação e cristalização da lipase LipC12; a segunda, à triagem, identificação, seqüenciamento, expressão, purificação, imobilização e caracterização da lipase LipC6G9; e a terceira, à triagem, identificação e seqüenciamento de outra enzima, provavelmente uma esterase, EstD12. Em seguida, a metodologia será descrita em duas partes: a primeira trata dos procedimentos utilizados para a lipase LipC12 e a segunda, para LipC6G9 e EstD12. A metodologia e resultados referentes às duas últimas serão apresentados numa única secção, visto que os procedimentos iniciais de seleção, identificação e seqüenciamento dos genes foram os mesmos para as duas enzimas, embora apenas LipC6G9 foi expressa e caracterizada com sua foldase. As enzimas associadas as suas foldases são referidas neste trabalho como LipC6G9-LifC6G9 e EstD12-LifD12.

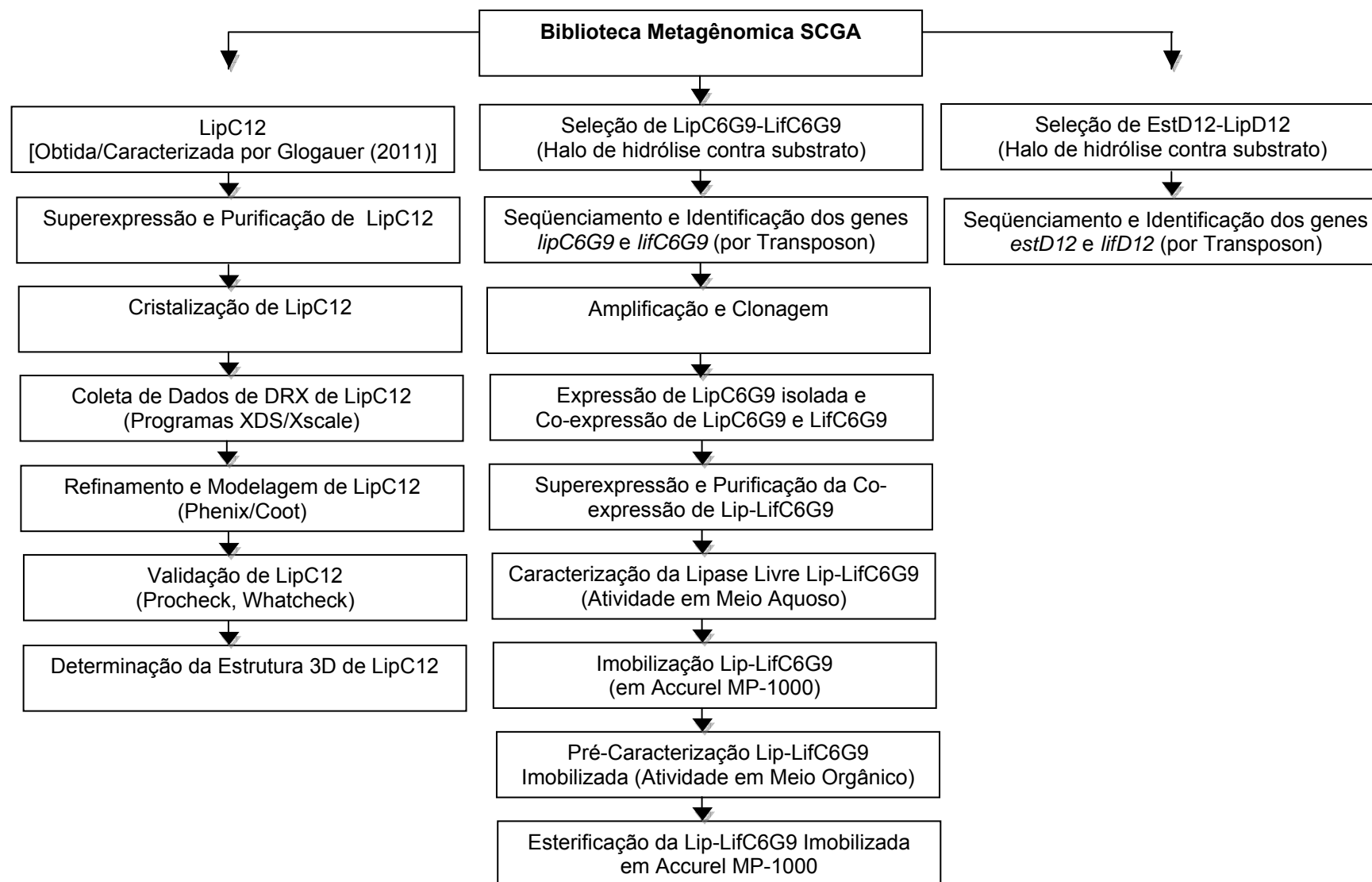


FIGURA 9 - ESTRATÉGIA E VISÃO GERAL DESTE TRABALHO

4.2 MICRORGANISMOS, VETORES, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES OU *PRIMERS*

A biblioteca metagenômica SCGA (Solo Contaminado com Gordura Animal) montada por GLOGAUER (2011) foi construída com vetor fosmidial PCC2FOS, tendo como célula hospedeira a estirpe *E. coli* EPI300-T1^R, (*EPICENTRE Biotechnologies*, Madison, WI, USA). Os vetores pET28a(+) (Novagen, Madison, USA), pET29b(+) (Novagen, Madison, USA), pT7-7 (USB, Cleveland, OH, USA) foram utilizados na clonagem e expressão da lipase nas células hospedeiras *E. coli* TOP10 (Novagen, Madison, USA) e *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação e clonagem do inserto seqüenciado da biblioteca SCGA foram obtidos da Prodimol Biotechnologies (BR). Para o seqüenciamento e purificação do DNA foram utilizados os kits transposon EZ-Tn5TM <orV/ KAN-2> (Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA) e NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co, USA).

4.2.1 Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados, preparados segundos SAMBROOK *et al.* (1989), para o crescimento das estirpes de *E. coli* foram o meio Luria Bertani (LB, contendo triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹) LA (LB, contendo triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹) e *Terrific Broth* (TB, contendo triptona 12 g L⁻¹; extrato de levedura 24 g L⁻¹, glicerol 4% (V/V)).

4.2.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados para multiplicação, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* e dos plasmídeos foram: cloranfenicol 12,5 µg mL⁻¹ (Cm^{12,5}), cloranfenicol 30 µg mL⁻¹ (Cm³⁰), ampicilina 100 µg mL⁻¹ (Amp¹⁰⁰), estreptomicina

40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sm^{40}) e canamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Km^{50}). Ampicilina, estreptomicina e canamicina foram dissolvidas em água ultrapura para as respectivas concentrações-estoque de 250, 40 e 100 mg mL^{-1} . O cloranfenicol foi dissolvido em etanol 95% (m/v) para a concentração-estoque de 30 mg mL^{-1} .

4.2.3 Reagentes e Materiais Consumíveis

Enzimas de restrição (NdeI, HindIII) e modificadoras de DNA (Taq polimerase), RNase, tampões e sais para preparar as soluções utilizadas na manipulação do DNA foram todas de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidas de Fermentas, (Int., Burlington, Ontario, Canadá). Para indução da expressão da lipase foi utilizado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Invitrogen Life Technologies, USA). Os ensaios de cromatografia de afinidade foram feitos com uma coluna HiTrap Chelating HP de 5 mL (GE Life Sciences, Uppsala, Suécia). Para a caracterização da lipase foram utilizados substratos trioleína (C18, 65%), tricaprilina (C8, 99%) e tributirina (C4, 98%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A FIGURA 10 mostra as estruturas dos triacilgliceróis de ácidos graxos.

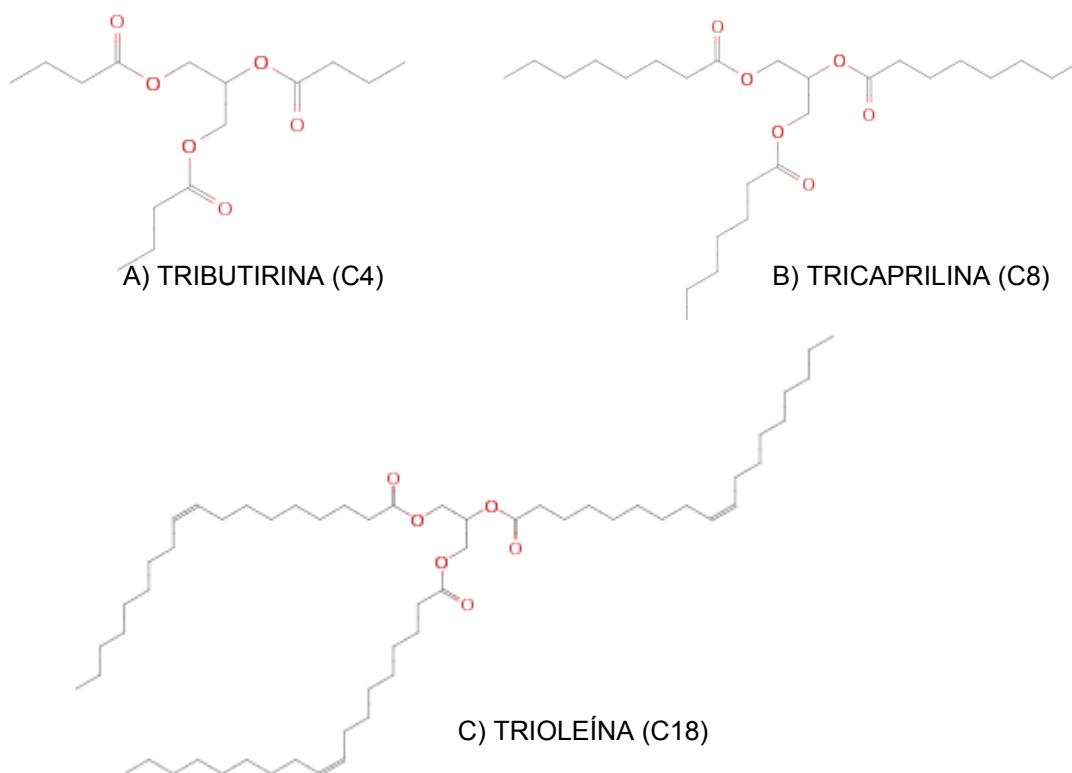


FIGURA 10 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS SUBSTRATOS, (A) TRIBUTIRINA (C4), (B) TRICAPRILINA (C8) E (C) TRIOLEÍNA (C18).

O material utilizado para a imobilização da lipase foi o polipropileno Accurel MP – 1000 (Membrana GmbH, Obernburg, Germany), com as seguintes características: área de superfície ($55,985 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), densidade da partícula ($1,993 \text{ g cm}^3$), porosidade das partículas (0,70), tamanho das partículas ($< 1500 \mu\text{m}$). Os solventes *n*-heptano e *n*-hexano (99,5%) utilizados nas reações de esterificação foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), o etanol (99,5%) utilizado foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil), e o ácido oleico (90%), da (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.3 BIBLIOTECA METAGENÔMICA

A biblioteca metagenômica utilizada neste trabalho foi construída por GLOGAUER (2011). Os fragmentos de DNA maiores que 36.000 Kb foram clonados no vetor pCC2FOS gerando a biblioteca metagenômica de clones em *E. coli* EPI300. A biblioteca conta com 30.000 clones individuais e mais de 400.000 clones estocados na forma de “pools” de células infectadas (vetor fosmidial pCC2FOS e *E. coli* hospedeira EPI300-T1^R, EPICENTRE Biotechnologies).

Uma prospecção de atividade inicial realizada na biblioteca SCGA por GLOGAUER (2011) revelou que, do total dos 400.000 clones, 127 têm atividade hidrolítica para tributirina e tricaprilina, e, desses, 32 clones apresentaram halo de hidrólise para trioleína, indicando atividade lipolítica. Quatro clones com atividade hidrolítica para trioleína foram isolados a partir dos 127 clones. O clone C12, mais tarde denominado LipC12, foi objeto de pesquisa de GLOGAUER (2011), sendo a enzima isolada, clonada, expressa e caracterizada. Os resultados estão publicados em GLOGAUER *et al.* (2011). No presente trabalho, essa lipase foi cristalizada e teve sua estrutura tridimensional determinada. Outros três clones C6, G9 e D12 foram selecionados neste trabalho. Mais tarde, descobriu-se que os clones C6 e G9 expressavam a mesma enzima, e este passou então a ser denominado de LipC6G9. Essa enzima foi isolada, clonada, expressa e caracterizada, os procedimentos serão detalhados adiante. Para o quarto clone, EstD12, embora tenha sido isolado e identificado neste trabalho, a enzima não foi expressa e nem caracterizada.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA LIPASE LipC12

A lipase LipC12, que havia sido anteriormente identificada e caracterizada por GLOGAUER (2011) teve sua estrutura tridimensional determinada no presente trabalho. Para tanto, a enzima foi superexpressa, purificada e cristalizada para obtenção de sua estrutura através da difração de raios X (DRX), conforme descrito a seguir.

4.4.1 Superexpressão, Purificação e Cristalização de LipC12

O gene *lipC12*-pET28a(+) anteriormente clonado, foi superexpresso e purificado segundo GLOGAUER *et al.* (2011). A concentração de LipC12 purificada foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976). Após a dosagem, a proteína foi concentrada através do equipamento Vivaspin 6 (GE Healthcare) até 10,1 mg mL⁻¹.

Os ensaios de cristalização foram realizados no robô de cristalização Genomic Solutions Cartesian (Digilab Genomic Solutions) do Instituto de Física da USP de São Carlos. O método de cristalização utilizado foi à difusão de vapor por gota sentada (McPHERSON, 1999) em placas de cristalização de 96 poços. No método de difusão de vapor por gota sentada, uma pequena gota de solução da proteína insaturada é sustentada em uma plataforma cercada por um reservatório de solução do precipitante (solução-mãe) (McREE, 1999). Um volume igual de solução-mãe (solução precipitante mais tampão) é misturado com a solução da proteína e o ambiente é selado por fora, colocando uma lamínula de vidro sobre a borda do poço lubrificado. No ambiente fechado, a gota sentada tem inicialmente uma osmolaridade menor do que o reservatório e a água é perdida para o reservatório por difusão do vapor. O resultado é a diminuição do volume da gota, ocorrendo concentração tanto da proteína quanto do precipitante, e a proteína pode ser assim levada ao estado supersaturado e a formar cristais. Três concentrações diferentes da proteína foram testadas. Na posição 1 da placa, a concentração inicial (10,1 mg mL⁻¹) foi diluída em água ultrapura 1:2, resultando em 5,0 mg mL⁻¹; na posição 2, manteve-se a concentração original de 10 mg mL⁻¹;

na posição 3, a proteína foi concentrada 2:1, através do Vivaspin 6 (GE Healthcare), resultando na concentração de 20,2 mg mL⁻¹. Foram utilizados os kits de cristalização da Qiagen: PEG Suite I, Classic I e Classic II, e os kits da Hampton SaltRX e Index, sendo misturados 1 µL da solução da proteína com 1 µL da solução precipitante. A solução precipitante no poço (preparada com os kits da Qiagen e Hampton) tinha um volume de 100 µL. No total, foram preparadas 5 placas com 96 condições distintas, cada uma com três gotas da solução da proteína com a solução precipitante do poço, perfazendo, portanto, um total de 1440 ensaios de cristalização, embora alguns tenham sido perdidos pelo robô de cristalização.

4.4.2 Coleta de Dados de Difração de Raios X, Substituição Molecular, Refinamento e Validação da Estrutura de LipC12

Os cristais selecionados para a coleta foram transferidos para uma solução crioprotetora, que consistiu na solução precipitante original, acrescida de um crioprotetor, que nesse caso foi o etilenoglicol 20% (V/V). Os dados de difração foram coletados em um gerador ânodo rotatório Micromax-007 e detector R-Axis IV⁺⁺ (Rigaku) no Instituto de Física de São Carlos - USP. Para o processamento dos dados de raios X, foi utilizado o pacote de programa computacional Xds/Xscale (KABSCH, 1994). O modelo inicial de substituição molecular foi preparado pelo programa ChainSaw (STEIN, 2008). O programa Phaser (McCOY *et al.* 2007) foi utilizado para encontrar a rotação e translação da molécula. Para o refinamento e modelagem da estrutura, os programas utilizados foram: Phenix (AFONINE, GROSSE-KUNSTLEVE, ADAMS, 2005) e Coot (EMSLEY e COWTAN, 2004), sendo o modelo ajustado às observações experimentais, com preferencial uso dos mapas 2mFo-DFc (densidade eletrônica) e mFo-DFc (Fourier diferença). Os programas utilizados para a validação da estrutura foram Procheck (LASKOWSKI *et al.* 1993), Whatcheck (HOOFT *et al.* 1996), Sfcheck (VAGUINE *et al.* 1999), ValidationPDB (WESTBROOK *et al.* 2003). Para o cálculo dos índices de ajuste na densidade eletrônica (JONES *et al.* 1991), RSR, valor residual no espaço real, e RSCC, coeficiente de correlação no espaço real, utilizou-se o programa Mapman (KLEYWEGT e JONES, 1996).

4.5 SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA SCGA

4.5.1 Triagem para Atividade Lipolítica Utilizando Métodos de Alto Desempenho

Para selecionar enzimas lipolíticas foi realizada uma triagem na biblioteca metagenômica utilizando um meio seletivo que consiste em uma emulsão de LA (Luria Bertani Agar) acrescida 1% (V/V) dos substratos tributirina, tricaprilina ou trioleína (SJOLING *et al.* 2006). O meio de cultura seletivo para a triagem dos clones produtores de lipase foi preparado nas seguintes concentrações (g L^{-1}): 5, peptona, 3, extrato de levedura, 13, ágar e 1% (V/V) de tributirina ou tricaprilina ou trioleína, então homogeneizado com auxílio de um mixer manual por 5 a 10 min. O meio emulsionado foi esterilizado e agitado ainda quente por 5 min. Ao meio seletivo foram adicionados cloreto de cálcio, na concentração final 1 mmol L^{-1} , antibiótico Cm^{12,5} $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e arabinose na concentração de 0,01% (m/V) para aumentar o número de cópias do foscídeo (vetor pCC2FOS) por célula e, por conseguinte, aumentar a expressão das enzimas. Foram utilizadas placas de Petri de 150 x 15 mm e o volume de meio adicionado foi de 35 mL.

A pesquisa e a confirmação dos clones utilizados no presente trabalho foram realizadas nos 127 clones que já tinham apresentado atividade hidrolítica anteriormente, como descrito por GLOGAUER (2011). Os 127 clones com atividade hidrolítica, estocados -24°C estavam contidos em duas microplacas de 96 poços, com cada poço contendo 150 μL de meio TB (*Terrific Broth*), antibiótico Cm^{12,5} $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e glicerol 50% (V/V). Os clones foram repicados nas placas de Petri contendo os meios seletivos: tributirina, tricaprilina e trioleína. Depois de repicados, os clones foram deixados em estufa a 37°C , por até 7 dias.

Três clones positivos (*lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* e *estD12-lifD12*) foram identificados com base no aparecimento de um halo transparente ao redor de colônias crescidas em placas de Petri contendo o meio seletivo. Dos três clones selecionados, dois apresentaram atividade em meio seletivo para os três substratos (clones *lipC6-lifC6* e *lipG9-lifG9*, denominação segundo a posição na

placa de 96 poços), porém, o clone (*estD12-lifD12*) não apresentou atividade em meio seletivo com trioleína.

4.5.2 Seqüenciamento dos Clones *lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* e *estD12-lifD12*

Os três clones selecionados (*lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* e *estD12-lifD12*) foram seqüenciados pela técnica de transposon (EZ-Tn5™ <oriV/ KAN-2> Insertion Kit Epicentre® Biotechnologies). A técnica de inserção de transposon para o seqüenciamento consiste em inserir aleatoriamente *in vitro* o transposon com gene de resistência à Km no recombinante pCC2FOS-*lipC6-lifC6*, pCC2FOS-*estD12-lifD12* e pCC2FOS-*lipG9-lifG9* com auxílio da enzima transposase, utilizando o kit Epicentre EZ-Tn5™, cujas instruções foram seguidas. Após a inserção, os transformantes selecionados foram transferidos para placas de Petri grandes de 150 x 15 mm contendo meio LA e deixados em estufa a 37 °C, por 12 h. Os clones assim selecionados foram submetidos à extração para a obtenção de seus DNAs plasmidiais (pDNAs), segundo o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989).

Após uma identificação prévia dos pDNAs por géis de eletroforese agarose 1% (m/V), estes foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) para o seqüenciamento, no termociclador PCR Mastercycler gradient (Eppendorf 5331) programado nas seguintes condições: 1 min a 95 °C, onde ocorre a desnaturação inicial; uma seqüência de mudanças de temperatura que se repetem por 35 ciclos, de 45 s a 94 °C, de 45 s a 71 °C, para o anelamento do *primer* com a fita molde, e de 1 min e 30 s a 60 °C, para alongação da cadeia e por fim, diminuição da temperatura para 4 °C. Para a reação de PCR foram preparadas misturas de: 5 µL de água, 1 µL de *primers* específicos para transposon (492 F ou 493 R), 8 µL do premix Amersham [que possui desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs) e dideoxirribonucleosídeos trifosfatados (ddNTPs)] e 6 µL do pDNA. As amostras, após a PCR, foram purificadas, sendo precipitadas em 2 µL de acetato de amônio (7,5 mol L⁻¹) com 47,5 µL de etanol 99,5% (V/V) e centrifugadas 30.000 × g por 30 min. Os DNAs precipitados foram lavados com 100 µL de etanol 80% (V/V) e secados a vácuo para posterior seqüenciamento.

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador ABI377 (Genetic Analyzer, Applied Biosystems/HITACHI e MEGA BACE 1000 (GE Healthcare) ambos presentes no Laboratório Anexo (Biologia Molecular) do Departamento de Bioquímica da UFPR. As seqüências foram analisadas com os programas PHRED (EWING & GREEN, 1998) e *software* CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). As seqüências-consenso obtidas para cada clone foram analisadas e comparadas ao banco de dados NCBI (*Nacional Center for Biological Information*) usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997).

Os clones *lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* foram identificados após o seqüenciamento como contendo o inserto para a mesma enzima, sendo então denominados de *lipC6G9-lifC6G9*. Além disso, o resultado do seqüenciamento identificou genes de foldases associados aos genes das enzimas (lipase e esterase). Os genes da lipase e da esterase isolados foram denominados *lipC6G9* e *estD12*, respectivamente, e os genes de suas foldases correspondentes, *lifC6G9* e *lifD12*.

Foram desenhados *primers* para os quatro genes com o programa Invitrogen Vector NTI Advance11[®] (Invitrogen, USA) para amplificação dos genes das enzimas e respectivas foldases inteiras e com a região N-terminal truncadas, uma vez que a região amino-terminal não faz falta para a atividade das proteínas. Programas de bioinformática [TMHMM Server, SignalP (BENDTSEN *et al.* 2004) e ProtScale (GASTEIGER *et al.* 2005)] foram utilizados para prever o corte na região N-terminal das proteínas. Os *primers* desenhados foram sintetizados pela empresa Prodimol Biotecnologia (distribuidores da Integrated DNA Technologies IDT no Brasil, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Embora *primers* tenham sido desenhados para ambas as enzimas (*lipC6G9* e *estD12*) e suas foldases (*lifC6G9* e *lifD12*) correspondentes, foi realizada a clonagem apenas para *lipC6G9* e *lifC6G9*, pois ao contrário de *estD12* e *lifD12*, a primeira apresentou halo de hidrólise em meio seletivo com trioleína. A partir daqui serão descritas as metodologias utilizadas somente para a obtenção da lipase (LipC6G9) ativa. A TABELA 5 mostra os pares de *primers* específicos utilizados para amplificação e clonagem de *lipC6G9* e *lifC6G9*.

TABELA 5 - PARES DE *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *lipC6G9* E *lifC6G9*

<i>PRIMERS</i>	<i>AMPLIFICADO</i>	<i>VETOR</i>	<i>DENOMINAÇÃO</i>
5'- AGACATATGCTGATGATGAAGAGATGGC - 3' 5'- GATAAGCTTTAGTCCCAGCTCCTTGAGG - 3'	<i>lipC6G9</i> inteira	pET29b(+)	pET29b(+)- <i>lipC6G9int</i>
5'- AGACATATGCAGACCCGCTACCCCATAG - 3' 5'- GATAAGCTTTAGTCCCAGCTCCTTGAGG - 3'	<i>lipC6G9</i> N-truncada	pET29b(+)	pET29b(+)- <i>lipC6G9trunc</i>
5'- AGACATATGCAGACCCGCTACCCCATAG - 3' 5'- ATCAAGCTTATCCTCATAGTCCCAGCTC - 3'	<i>lipC6G9</i> inteira	pET28a(+)	pET28a(+)- <i>lipC6G9int</i>
5'- AGACATATGCAGACCCGCTACCCCATAG - 3' 5'- ATCAAGCTTATCCTCATAGTCCCAGCTC - 3'	<i>lipC6G9</i> N-truncada	pET28a(+)	pET28a(+)- <i>lipC6G9trunc</i>
5'- TTACATATGAGGATCGTCACCCTGCT - 3' 5'- ATCAAGCTTCCCCTTGTCATTGGCTT - 3'	<i>lifC6G9</i> inteira	pT7-7(+)	pT7-7(+)- <i>lifC6G9int</i>
5'- CTACATATGCAGCAAGGCGTACCTGC - 3' 5'- ATCAAGCTTCCCCTTGTCATTGGCTT - 3'	<i>lifC6G9</i> N-truncada	pT7-7(+)	pT7-7(+)- <i>lifC6G9trunc</i>

4.6 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA LIPASE *LipC6G9* E DE SUA FOLDASE *LifC6G9*

4.6.1 Amplificação dos Genes *lipC6G9* e *lifC6G9*

Foi realizada a amplificação e clonagem dos genes da lipase *lipC6G9* e de sua foldase *lifC6G9*. Embora o seqüenciamento tenha identificado os dois genes associados, foi realizada a clonagem destes separadamente, inteiros ou N-truncados. Além disso, *lipC6G9* foi clonada nos vetores pET28a(+) e pET29b(+) com cauda His, e *lifC6G9* foi clonada em vetor pT7-7 sem cauda His, o que garantiria a purificação da lipase, associada ou não à foldase. A FIGURA 11 mostra uma representação esquemática das estratégias adotadas.

Para a amplificação, foi preparado um volume de reação de 20 μL com os seguintes reagentes: a) como molde, 1,0 μL do DNA fosmidial do clone C6G9 na concentração de 3 ng μL^{-1} ; b) 1,0 μL de cada *primer sense* e *anti-sense* na concentração de 10 pmol μL^{-1} ; c) 2,0 μL de tampão específico para Taq polimerase 10 X; d) 1,2 μL de solução de MgCl_2 25 mmol L^{-1} ; e) 1,0 μL de DMSO; f) 0,8 μL de DNTP 5 mmol L^{-1} ; g) 0,4 μL de enzima Taq-polimerase (5 U/ μL); h) e 11,6 μL de água ultrapura para completar o volume.

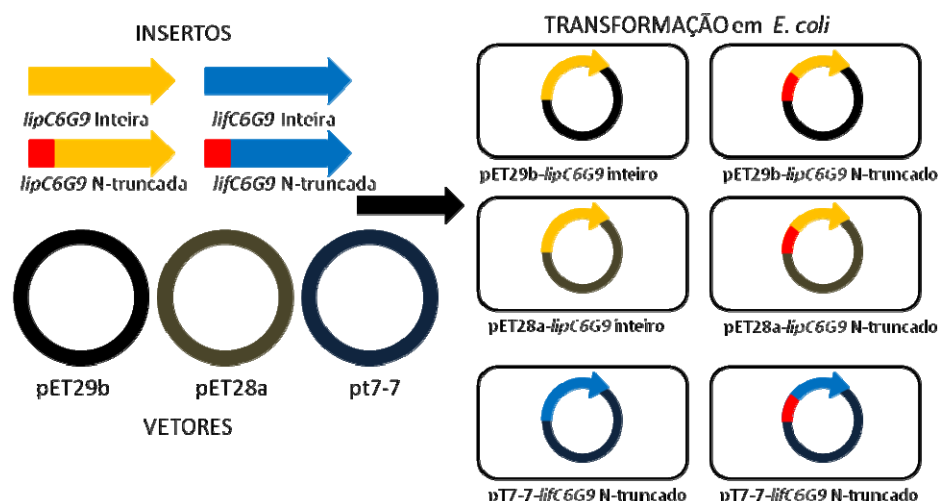


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS ADOTADAS PARA CLONAGEM DOS GENES *lipC6G9* E *lifC6G9* INTEIRAS OU TRUNCADAS NOS RESPECTIVOS VETORES DE EXPRESSÃO

A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf 5331). Para a reação de amplificação foram utilizadas temperaturas de anelamento diferentes. Os demais parâmetros foram ajustados conforme o protocolo do fabricante: desnaturação inicial do DNA durante 30 s a 98 °C por 35 ciclos, para o anelamento do *primer*, 60 s entre 58,4 °C a 60,2 °C e para elongação da cadeia, 1 min e 30 s a 72 °C. O DNA amplificado foi confirmado em gel de agarose 1% (m/V), conforme SAMBROOK *et al.* (1989).

O gel foi preparado fundindo-se agarose a 1% (m/V) em tampão TBE 1X (Tris 89 mmol L⁻¹, ácido bórico 89 mmol L⁻¹ e EDTA 2 mmol L⁻¹; pH 8). Para a corrida, utilizou-se o mesmo tampão. O DNA a ser analisado (5 µL) foi misturado com 3 µL de solução FSUDS [(azul de bromofenol 0,8% (m/V); ficol 10% (m/V); xileno cianol 0,4% (m/V), SDS 1% (m/V), EDTA 1,8 mmol L⁻¹; Tris-HCl 65 mmol L⁻¹, pH 8,0)] e aplicado no gel de agarose. Os géis de eletroforeses foram realizados 60 V. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para revelação das bandas de DNA. Incubou-se o gel por 30 min, lavando-o em água por mais 10 min para eliminação do excesso do corante. As bandas foram visualizadas em um sistema de documentação de imagens (UVP UltraViolet Products, Upland, CA), irradiando o gel com UV no comprimento de onda de 312 nm.

Após a amplificação, foi realizada a digestão do material com as enzimas de restrição NdeI e HindIII; para tanto, foram adicionados 2 µL de cada enzima, 2,22 µL tampão *react* 2 em 17 µL do amplificado. O material foi incubado em estufa a 37 °C *overnight* e as enzimas foram inativadas a 80 °C por 20 min. Posteriormente, o amplificado foi purificado com o kit de extração de gel NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co, Dueren, Alemanha).

4.6.2 Preparação dos Vetores com as Enzimas de Restrição NdeI e HindIII

Para preparar os vetores para ligação, foi realizada a extração do DNA plasmidial em *E. Coli* Top10 contendo os vetores vazios pET29b(+), pET28a(+) e pT7-7, segundo o protocolo SAMBROOK *et al.* (1989). Os três vetores foram cortados com as enzimas NdeI e HindIII a 37 °C *overnight* e as enzimas foram inativadas a 80 °C por 20 min. Os vetores foram purificados com 10 µL de acetato de sódio (3 mol L⁻¹, pH de 4,8), dois volumes de etanol absoluto e centrifugados por 15 min a 30.000 × g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 150 µL de etanol 70% (V/V), e seco por 20 min em dessecador. O *pellet* seco foi solubilizado 30 µL em água ultrapura. Os vetores foram quantificados em gel de agarose 1% (m/V) como descrito em 4.6.1.

4.6.3 Ligação e Clonagem dos Genes *lipC6G9* e *lifC6G9* nos Vetores pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7(+)

A proporção utilizada para a ligação do inserto e vetor foi de 5:1. Foi preparado um volume de 10 µL de reação, sendo adicionados 1 µL da enzima T4 ligase, 1 µL do tampão T4, 1 µL do vetor, 2 µL de inserto; o volume foi completado com água ultrapura. A TABELA 6 traz um resumo das ligações realizadas.

As reações (ligações) foram deixadas à temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, cada ligação foi transformada em célula de *E. coli* Top10 quimiocompetente, segundo o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). Os transformantes foram crescidos em 10 mL do meio LA, com 50 µg mL⁻¹ Km⁵⁰ e 40 µg mL⁻¹ Sm⁴⁰ para pET29b(+), pET28a(+) ou 100 µg mL⁻¹ Amp¹⁰⁰ e 40 µg mL⁻¹

Sm⁴⁰ para pT7-7. As ligações foram confirmadas a partir do padrão de corrida em gel de eletroforese agarose 0,4% (m/V) e posterior digestão com as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Então, os clones foram re-transformados em *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetente para testes de expressão.

TABELA 6 - LIGAÇÕES DOS VETORES pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7 COM OS INSERTOS DOS GENES *lipC6G9* E *lifC6G9*

COMBINAÇÃO	INSERTO	VETOR
1	<i>lipC6G9</i> inteira	pET29b(+)
2	<i>lipC6G9</i> N-truncada	pET29b(+)
3	<i>lipC6G9</i> inteira	pET28a(+)
4	<i>lipC6G9</i> N-truncada	pET28a(+)
5	<i>lifC6G9</i> inteira	pT7-7
6	<i>lifC6G9</i> N-truncada	pT7-7

4.6.4 Testes de Expressão das Proteínas LipC6G9 e LifC6G9

As células transformadas foram inoculadas em 10 mL de meio LB contendo 50 µg mL⁻¹ Km⁵⁰ ou 100 µg mL⁻¹ Amp¹⁰⁰, conforme a resistência do plasmídeo [Km⁵⁰ para pET28a(+) ou pET29b(+) e Amp¹⁰⁰ para pT7-7] e crescidas a 37 °C, em um agitador orbital a 180 rpm. Quando o meio atingiu uma D.O₆₀₀ de 0,5, alíquotas foram coletadas para serem aplicadas no gel de SDS-PAGE 12% (descrito em 4.11). Ao restante da cultura foram adicionados 0,2 mmol L⁻¹ IPTG, incubando-se por mais 3 h na mesma temperatura e agitação. Após esse tempo, novas alíquotas foram coletadas. O restante da cultura foi centrifugado, o *pellet* foi solubilizado em solução contendo 700 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ imidazol, 10 mmol L⁻¹ β-mercaptoetanol, 2 mmol L⁻¹ de CaCl₂, 1% Triton X-100 (V/V) e 10% (V/V) glicerol, e sonicado (cerca de 10 vezes seqüenciais, com intervalos de 20 s). Este material foi novamente centrifugado por 15 min a 30.000 × g a 4 °C, recolhendo-se amostras do solúvel (sobrenadante) e do insolúvel para os géis de eletroforese SDS-PAGE. Como controle negativo, foram realizados os mesmos procedimentos para os vetores vazios pET29b(+), pET28a(+) e pT7-7 contidos na estirpe BL21 (DE3), além da própria *E. coli* vazia, isto é, sem plasmídeo. As amostras foram submetidas à géis de eletroforese SDS-PAGE em gel acrilamida 12% (LAEMMLI, 1970).

Novamente, os genes *lipC6G9* e *lifC6G9* clonados nos seus respectivos plasmídeos (TABELA 6) foram seqüenciados com os mesmos *primers* utilizados para amplificação *lipC6G9* e *lifC6G9* inteiros e truncados e *primers* Promotor e Terminador T7 dos vetores. Esse seqüenciamento confirmou que os insertos clonados nos vetores possuíam um quadro de leitura de códons corretos, algumas vezes aqui referenciado como “seqüência em *frame*”.

4.6.5 Co-expressão de LipC6G9 e LifC6G9

Após confirmação da expressão das proteínas LipC6G9 inteira e N-truncada, LifC6G9 inteira e N-truncada separadamente, foram feitos ensaios de co-expressão da lipase e foldase em diferentes combinações. Foram realizadas 8 diferentes co-transformações listadas na TABELA 7 e representadas esquematicamente na FIGURA 12.

TABELA 7 - CO-TRANSFORMAÇÕES DO GENE DA LIPASE *lipC6G9* E DO GENE DA FOLDASE *lifC6G9* NOS VETORES DE EXPRESSÃO pET29b(+), pET28a(+) E pT7-7

COMBINAÇÃO*	NÚMERO LIPASE	LIPASE	NÚMERO FOLDASE	FOLDASE
1.5	1	pET29b(+)- <i>lipC6G9int</i>	5	pT7-7- <i>lifC6G9int</i>
1.6	1	pET29b(+)- <i>lipC6G9int</i>	6	pT7-7- <i>lifC6G9trunc</i>
2.5	2	pET29b(+)- <i>lipC6G9trunc</i>	5	pT7-7- <i>lifC6G9int</i>
2.6	2	pET29b(+)- <i>lipC6G9trunc</i>	6	pT7-7- <i>lifC6G9trunc</i>
3.5	3	pET28a(+)- <i>lipC6G9int</i>	5	pT7-7- <i>lifC6G9int</i>
3.6	3	pET28a(+)- <i>lipC6G9int</i>	6	pT7-7- <i>lifC6G9trunc</i>
4.5	4	pET28a(+)- <i>lipC6G9trunc</i>	5	pT7-7- <i>lifC6G9int</i>
4.6	4	pET28a(+)- <i>lipC6G9trunc</i>	6	pT7-7- <i>lifC6G9trunc</i>

*Para facilidade prática, foi dado um número que identifica a clonagem realizada para a lipase e foldase, identificando assim também as co-expressões realizadas.

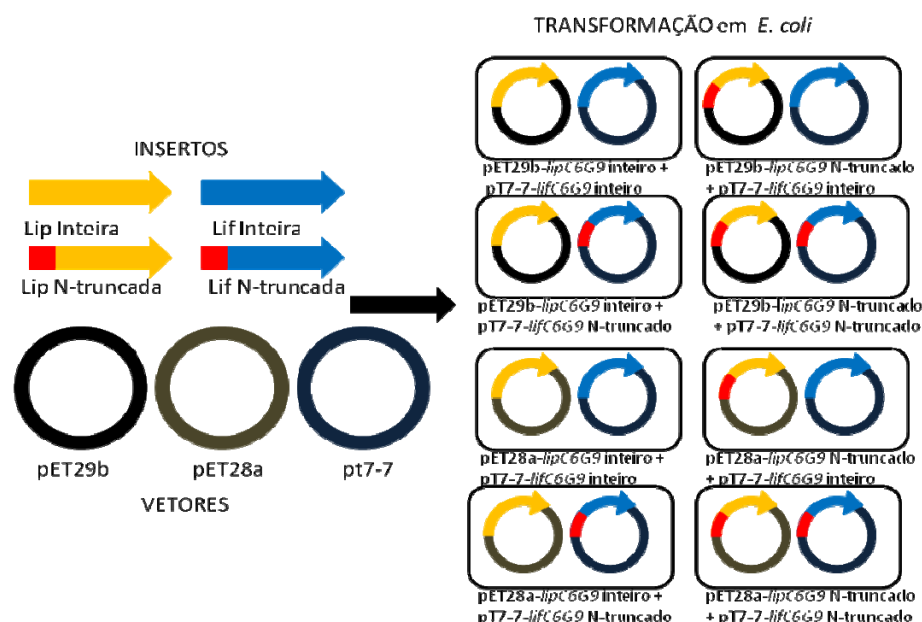


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CO-EXPRESSÕES DOS GENES *lipC6G9* E *lifC6G9* TESTADAS EM DIFERENTES VETORES DE EXPRESSÃO

Após as co-transformações, foram realizados testes de expressão em gel de acrilamida 12% SDS-PAGE, utilizando o método descrito por LAEMMLI (1970). Novamente, extratos com meio de cultura LB mais $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Amp¹⁰⁰ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Km⁵⁰ foram preparados para as 8 co-expressões. O mesmo procedimento descrito no item 4.6.4 foi realizado e alíquotas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

4.7 TESTES DE ATIVIDADE PARA AS CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 e FOLDASE LifC6G9

Uma vez que os testes de expressões da LipC6G9 e LifC6G9 foram positivos e suas seqüências confirmadas, foram realizados testes de atividade para a lipase dissociada e associada à sua foldase. Foram produzidos extratos brutos para as co-expressões enumeradas nas TABELAS 6 e 7, a fim de selecionar aquela de maior atividade para posterior superexpressão e purificação.

Os extratos brutos foram preparados com volumes 10 mL de meio de cultura TB com os antibióticos $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Amp¹⁰⁰ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Km⁵⁰ e inoculados individualmente com células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas anteriormente e estocadas a -24°C em meio LB contendo 25% (V/V) de glicerol. O mesmo

procedimento descrito no item 4.6.4 foi realizado, porém, após sonicação, foram medidas as atividades dos extratos das expressões e co-expressões da lipase. Foram realizados os testes de expressão e atividade para a lipase isolada e co-expressa com sua foldase a fim de selecionar aquela em que a lipase se apresentasse ativa.

Todos os ensaios da atividade dos extratos foram realizados no equipamento pHStat (718 Stat Titrino, Metrohm), pelo método titulométrico (STUER, JAEGER e WINKLER, 1986) utilizando o substrato tricaprilina, a 30 °C, pH 7,5. Cada ensaio requer 20 mL de uma emulsão que foi preparada no liquidificador por 10 min com 67 mmol L⁻¹ tricaprilina, 2,5 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 2 mmol L⁻¹ CaCl₂ e 3% goma arábica (m/V). Foram adicionados 200 µL do extrato na emulsão. O equipamento registra o volume de NaOH (0,05 mol L⁻¹) gasto para titular os ácidos graxos liberados por 5 min a 30 °C. Uma unidade de atividade enzimática é equivalente a 1 µmol de ácido graxo produzido na unidade de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.1 Superexpressão, Purificação e Caracterização de Lip-LifC6G9

A co-expressão da lipase e foldase N-truncadas [pET28a(+)-*lipC6G9trunc* + pT7-7-*lifC6G9trunc*, TABELA 7], que apresentou uma elevada atividade comparada às demais, foi selecionada para purificação e caracterização da enzima. Neste trabalho, esta co-expressão será por vezes referida como “lipase LipC6G9 e foldase LifC6G9” ou simplesmente como “Lip-LifC6G9”.

Para tanto, colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo os plasmídeos pET28a(+)-*lipC6G9trunc* e pT7-7-*lifC6G9trunc*, respectivamente, foram estocadas a -24 °C em meio LB e 25% (V/V) de glicerol. Essas células estocadas serviram para o pré-inóculo, realizado com 10 mL do meio LB, mais os antibióticos 50 mg mL⁻¹ Km⁵⁰ e 100 mg mL⁻¹ Amp¹⁰⁰, cultivado a 37 °C em agitador orbital a 180 rpm. Após 24 h, 2 mL deste pré-inóculo foram divididos entre 4 Erlenmeyers de 2 L, contendo 500 mL de meio LB com 100 µg mL⁻¹ Amp¹⁰⁰ e 50 µg mL⁻¹ Km⁵⁰ e incubados a 37 °C. Quando a D.O₆₀₀ do meio atingiu 0,6, foi adicionado IPTG 0,5 mmol L⁻¹, e o meio foi incubado a 20 °C por mais 16 h. Em seguida, o volume foi dividido igualmente em tubos tipo Falcon de 50 mL, que foram centrifugados a

$4.700 \times g$ a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 40 mL de tampão de lise contendo 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, 10 mmol L^{-1} β -mercaptoetanol, 2 mmol L^{-1} de CaCl_2 , 1% Triton X-100 (V/V) e 10% (V/V) glicerol. Posteriormente, este material foi transferido para um bequer de 100 mL e sonicado em banho de gelo por cerca de 10 min em 10 vezes seqüenciais, com intervalo de 30 s. Após a lise, o conteúdo foi transferido para um tubo e centrifugado por 40 min a $30.000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi colocado em tubo tipo Falcon autoclavado (já previamente resfriado no gelo) para posterior purificação da enzima.

Lip-LifC6G9 foi purificada em cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni^{2+}) (HisTrap™) de 5 mL no equipamento cromatográfico fase líquida (HPCL/FPLC) AKTA pH/C-900 (Amersham/Bioscience). O princípio deste tipo de purificação se baseia na afinidade das proteínas com cauda de histidina (*His-tag*) pelos metais de transição (interação entre as proteínas em solução e íons metálicos Ni^{2+} imobilizados num suporte sólido). Essa modificação na proteína é conferida pelo vetor de expressão pET28a(+), que adiciona uma cauda de histidina (*His-tag*) na extremidade N-terminal da enzima, e permite uma eficiente purificação da proteína (PORATH, 1992). Para tal, foram utilizados dois tampões desaerados: tampão (A): 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L^{-1} de NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, 10 mmol L^{-1} β -mercaptoetanol, 1% de Triton X-100 e 10% (V/V) glicerol; tampão (B): 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L^{-1} de NaCl, 1 mol L^{-1} imidazol, 10 mmol L^{-1} β -mercaptoetanol, 1% de Triton X-100 e 10% (V/V) glicerol.

Em seguida, este material foi injetado na coluna de níquel (Ni^{2+}), com eluição com o tampão A ($1,5\text{ mL min}^{-1}$), cujo objetivo foi o de retirar os contaminantes. Após isto, foi realizado um gradiente de 20% de concentração com os dois tampões, para eluição do complexo Lip-LifC6G9. Foram coletadas frações de 1,5 mL, cujo conteúdo proteico foi determinado por leitura direta a 280 nm no próprio equipamento.

A expressão e purificação da proteína foram verificadas por géis de eletroforese SDS-PAGE, em gel acrilamida 12%, (LAEMMLI, 1970). As frações contendo proteínas foram reunidas e dialisadas por 12 h com o tampão 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L^{-1} de NaCl e 20% (V/V) de glicerol, de modo retirar todo o imidazol das amostras. Para determinar a percentagem de pureza

das amostras, utilizou-se a análise densitométrica do gel SDS-PAGE corado segundo o software LabWorks Image Acquisition e Analysis Software 4.0 (UVP BioImaging Systems, Upland, CA). A dosagem da concentração de proteínas da enzima purificada foi realizada utilizando o método de BRADFORD (1976), utilizando BSA como padrão. A enzima purificada foi armazenada a 4 °C e utilizada nos ensaios descritos a seguir.

4.7.2 Confirmação das Bandas de Expressão de Lip-LifC6G9

Um fragmento de gel SDS-PAGE (item 4.7.1) da banda referente à proteína LipC6G9 e outro fragmento referente à LifC6G9 foram excisados e tratados com tripsina segundo protocolo de WESTERMEIER e NAVEN (2002). Os peptídeos hidrolisados foram analisados em espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS Autoflex mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As massas encontradas foram comparadas com as massas previstas segundo clivagem peptídica com tripsina *in silico* pelo programa ProteinProspector v.5.7.2 (CHALKLEY *et al.* 2005). O programa ProtParam (GASTEIGER *et al.* 2005) foi usado para calcular os parâmetros teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico (pI) das proteínas LipC6G9 e LifC6G9.

4.7.3 Zimograma de Lip-LifC6G9

Para determinação das bandas de proteínas que apresentavam atividade no gel SDS PAGE, foi realizado um zimograma da fração purificada da proteína. O complexo purificado foi submetido à eletroforese SDS-PAGE, pelo método LAEMMLI (1970), utilizando um tampão de amostra sem β -mercaptoetanol e sem SDS (dodecil sulfato de sódio). As amostras (não-fervidas) foram aplicadas no gel e após a corrida, o gel foi dividido ao meio, sendo uma parte corada com Coomassie Blue R250 e a outra parte lavada sequencialmente por 10 min em tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹, pH 7,5) contendo 1% de Triton X-100 e em mesmo tampão sem Triton X-100 (duas vezes). Após a lavagem, o gel foi colocado em placa de Petri e recoberto por uma camada de ágar (1,3%, m/V), previamente

emulsionado com 1% (V/V) de tributirina ou tricaprilina, 20 mmol L⁻¹ de NaCl e 1 mmol L⁻¹ de CaCl₂, e incubado por 24 h em estufa a 37 °C, conforme protocolo descrito na literatura (OH *et al.* 1999). As bandas com atividade foram visualizadas pelo aparecimento de um halo transparente no gel de ágar referente à hidrólise do substrato.

4.7.4 Análise Filogenética e Estimativa da Estrutura Secundária da Lipase LipC6G9

Para determinar a família da nova lipase, sua seqüência foi alinhada juntamente com 25 seqüências de aminoácidos previamente agrupadas por ARPIGNY e JAEGER (1999), pertencentes à família I e II de lipases, com base nos motivos das seqüências conservadas e nas propriedades bioquímicas das enzimas. Além das 25 seqüências de aminoácidos, mais 8 seqüências adicionais foram alinhadas com LipC6G9 por se tratarem de seqüências de maior identidade, resultados esses advindos do alinhamento do BLAST (NCBI), (ALTSCHUL *et al.* 1997). Alinhamentos múltiplos das seqüências foram realizados com o programa ClustalW (THOMPSON *et al.* 1994). A análise filogenética foi construída pelo método *Neighbor Joining* usando o programa MEGA version 5 (TAMURA *et al.* 2011).

Para determinação da estrutura secundária de LipC6G9, foram utilizados os programas computacionais DSSP (KABSCH e SANDER, 1983) e ALINE (BOND e SCHÜTTELKOPF, 2009). O programa alinhou a seqüência da proteína LipC6G9 com as seqüências obtidas do PDB (Protein Data Bank), 1EX9.pdb, 1YSL.pdb, 1OIL.pdb, 2ES4.pdb, 1TAH.pdb (código PDB).

4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE

O extrato enzimático purificado da lipase complexada à sua foldase (Lip-LifC6G9), preparado como descrito na seção 4.7.1, foi utilizado para a caracterização bioquímica da lipase. Os ensaios de caracterização consistiram na determinação da atividade da lipase, pelo método titulométrico descrito em 4.10.3,

para diferentes substratos naturais e alguns óleos comerciais, na determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade, e nos experimentos de estabilidade em solventes orgânicos polares. A estabilidade de Lip-LifC6G9 em solventes apolares não foi avaliada, pois um sistema bifásico pode ser formado, uma vez que a enzima está solubilizada em tampão, impedindo o contato direto da enzima com o solvente e gerando um falso resultado de estabilidade (MÜLLER-SANTOS, 2009).

4.8.1 Especificidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Diferentes Substratos

Os substratos usados para a determinação da especificidade da enzima foram: trioleína (Sigma-Aldrich, 65%), tricaprilina (Sigma-Aldrich 90%) e tributirina (Sigma-Aldrich 99%) (FIGURA 10). Também foi determinada a atividade de Lip-LifC6G9 para óleos comerciais, sendo preparadas emulsões utilizando os óleos comerciais de oliva, milho, canola, palma, girassol, mamona, côco e de soja (novo e residual de frituras). Para esses ensaios, a emulsão adicionada ao reator do equipamento pHStat (718 Stat Titrino, Metrohm) foi preparada com os respectivos substratos naturais (triacilgliceróis) e óleos comerciais, como descrito em 4.10.3, sendo utilizada a concentração de 67 mmol L⁻¹.

4.8.2 Efeito da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9

O efeito da temperatura na atividade de hidrólise foi medido na faixa de 20 a 60 °C, em pH 7,5, com o substrato tricaprilina. A estabilidade da enzima em diferentes temperaturas foi investigada pela determinação da atividade residual depois da incubação em diferentes temperaturas (0 - 80 °C), por 1,5 h. As medidas de atividade residual (%) foram realizadas pelo método titulométrico, a 30 °C. A atividade da enzima incubada a 30 °C foi estabelecida como 100%.

4.8.3 Efeito do pH na atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9

O efeito do pH na atividade da lipase foi determinado entre pH 5,0 a 11,0, a 30 °C. A estabilidade da enzima na faixa de pH de 5,0 a 10,0 foi determinada pela incubação durante 1,5 h a 30 °C nos tampões citrato, MES (ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado), citrato-fosfato, Tris-HCl, glicina, na concentração de 50 mmol L⁻¹, determinando-se em seguida a atividade residual para tricaprilina em pH 7,5, considerando-se 100% a atividade com Tris-HCl pH 7,5.

4.8.4 Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Solventes Orgânicos Hidrofílicos

A estabilidade da lipase purificada em diferentes solventes foi determinada pela incubação da enzima por 1,5 h a 30 °C em acetona (log P -0,23), etanol (log P -0,24), dimetil sulfoxido (DMSO, log P -1,3), tetrahidrofurano (THF, log P 0,49), acetonitrila (log -0,33) e isopropanol (log P 0,28), nas concentrações 25, 50 e 75% (V/V). Tipicamente, uma solução enzimática contendo 0,025 mg de proteína foi adicionada, em 40 µL de solvente. Após a incubação, 40 µL da solução contendo a proteína mais o solvente foram adicionadas diretamente no meio reacional do método titulométrico, contendo tricaprilina como substrato. As atividades residuais foram calculadas em relação a um controle, que consistiu em incubar a enzima em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 pelo mesmo período e temperatura; a atividade, neste caso, foi considerada 100%.

4.8.5 Imobilização da Lipase Lip-LifC6G9 em Accurel MP-1000

4.8.5.1 Preparação do Suporte

Para a imobilização, foi utilizado o método proposto por AL-DURI e YONG (2000). O suporte Accurel MP-1000 (0,1 g) foi umedecido com solução de etanol (50% em água, V/V) por 30 min a fim de excluir o ar contido dentro das partículas. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada e filtrado.

Em um Erlenmeyer de 5 mL, colocou-se a solução enzimática e o suporte nas proporções e condições requeridas para cada experimento. Esta mistura foi

agitada a 150 rpm, a 4 °C. O suporte foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por cerca de 16 h, a 4 °C e armazenado na mesma temperatura.

Foi calculada a eficiência (E%) e a retenção da atividade (R%) do processo de imobilização de Lip-LifC6G9. A eficiência de imobilização foi calculada a partir das diferenças entre a atividade inicial do sobrenadante antes da imobilização e a atividade residual depois da imobilização, conforme Equação 1 (YADAV e JADHAV, 2005).

$$E(\%) = \frac{U_{TEOR}}{U_{ENT}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

$$U_{TEOR} = U_{ENT} - U_{RESIDUAIS} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

Onde:

U_{TEOR} = Unidades de atividade adsorvida pelo suporte ou atividade da enzima teoricamente imobilizada (U), calculadas pela EQUAÇÃO 2;

U_{ENT} = Unidades de enzima disponíveis para a imobilização (U), isto é, atividade inicial total de hidrólise;

$U_{RESIDUAIS}$ = Unidades de atividade que sobraram após o processo de imobilização (U), isto é, atividade final total de hidrólise da solução sobrenadante.

A retenção da atividade (R) de Lip-LifC6G9 foi determinada pela atividade de hidrólise da enzima em meio orgânico (item 4.10.4) e meio aquoso (item 4.10.3), comparando a atividade adsorvida teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade (expressa em U/g de suporte) do sobrenadante no início e no fim do processo de imobilização (EQUAÇÃO 3), com a atividade da enzima imobilizada determinada experimentalmente.

$$R(\%) = \frac{U_{IMOB}}{U_{TEOR}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

Onde:

U_{IMOB} = Unidades de atividade experimental imobilizada (U);

U_{TEOR} = Atividade da enzima teoricamente imobilizada (U), calculada pela Equação 2.

4.8.5.2 Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para a Imobilização

Foi verificada a quantidade adequada de Lip-LifC6G9 para a imobilização pela determinação da saturação do suporte. A enzima foi diluída no tampão contendo 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ de NaCl e 20% (V/V) de glicerol e o suporte Accurel foi adicionado diretamente ao tampão contendo as proporções em massa de proteína e massa de suporte requeridas no ensaio. Foram estudadas razões que variaram de 1 a 15 mg de proteína por g de suporte. As misturas foram mantidas sob agitação, a 150 rpm, na temperatura de 4 °C. A fim de acompanhar a cinética de imobilização da enzima foram retiradas alíquotas de 200 µL do sobrenadante durante um período de 0 a 48 h. Foi então realizada a filtração a vácuo e secagem dos suportes por cerca de 16 h em dessecador na temperatura de 4 °C.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA

4.9.1 Atividade de Hidrólise em meio Aquoso e Orgânico para Trioleína

Após esse período, foi determinada a atividade (em meio orgânico e aquoso) da enzima imobilizada para as quantidades de 5, 10 e 15 mg de enzima por g de suporte. A atividade de hidrólise da enzima imobilizada foi determinada em meio aquoso pelo método titulométrico (STUER, JAEGER e WINKLER, 1986) com tricaprilina (C8), pH 7,5 a 30 °C, (4.10.3) e em meio orgânico a partir da hidrólise da trioleína em *n*-heptano, segundo o procedimento proposto por GONÇALVES (1999), com algumas modificações. Foi determinada a atividade da enzima imobilizada em meio reacional com 5 mL de *n*-heptano contendo 25 mg da enzima imobilizada, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 2% (V/V) de água destilada. A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm na temperatura de 40 °C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo (0 – 25 min) pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio reacional e dosagem de ácidos graxos livres pelo método de LOWRY-TINSLEY (1976), como descrito em 4.10.4.

4.9.2 Atividade de Esterificação

Foi realizada a reação de síntese do oleato de etila (FIGURA 13) com Lip-LifC6G9 imobilizada. As condições reacionais já haviam sido otimizadas para outras lipases (SALUM *et al.* 2008; FERNANDES *et al.* 2007). O meio reacional foi composto por 10 mL *n*-heptano ou *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico (Sigma Aldrich, 90%) e 210 mmol L⁻¹ de etanol (99,5%), sendo utilizada uma razão molar ácido graxo:etanol de 1:3. A reação foi iniciada por adição de 22 U (determinadas pelo método de atividade de hidrólise em meio orgânico) da enzima imobilizada e a mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm e 40 °C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio reacional, que foram analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual pelo método de LOWRY-TINSLEY (1976), descrito 4.10.4. A conversão em éster foi calculada a partir do consumo de ácidos graxos do meio reacional. Foram realizados também controles com a adição do suporte sem a lipase.

O método de LOWRY e TINSLEY (1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácido oleico durante as reações síntese do oleato de etila e de hidrólise da trioleína em meio orgânico, e possibilitar os cálculos dos rendimentos de esterificação e da atividade enzimática de hidrólise. No caso da reação de esterificação, a atividade foi calculada pelo desaparecimento do ácido graxo do meio reacional.

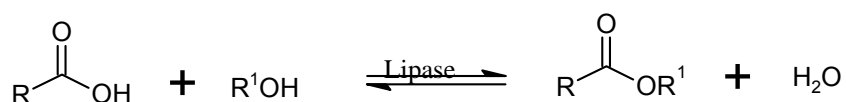


FIGURA 13- EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

4.9.3 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Solventes Orgânicos

Para verificar a estabilidade em solventes orgânicos, 13 mg da enzima imobilizada foram incubados em 2,0 mL dos seguintes solventes: tetrahydrofurano (THF, log P 0,49), etanol (log P - 0,24), *n*-hexano (log P 3,5), *n*-heptano (log P

4,0), dimetilsulfóxido (DMSO, log P -1,3), tolueno (log P 2,5), isopropanol (log P 0,28) e metanol (log P -0,76), utilizando-se tubos *eppendorfs* de 2,5 mL. Os tubos foram mantidos em banho termostatizado durante 4 e 8 h, a 30 °C. Posteriormente, o material foi removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e seco em dessecador por 16 h a 4 °C. A atividade residual da lipase foi verificada utilizando-se o método de hidrólise da trioleína em meio orgânico (item 4.10.4).

4.9.4 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Diferentes Temperaturas

Para este ensaio, 13 mg de enzima imobilizada foram adicionados em 2,0 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, utilizando-se tubos *eppendorfs* de 2,5 mL. Os tubos foram colocados em banho termostatizado, onde permaneceram durante 4 h em cada temperatura. As temperaturas utilizadas foram 30 °C, 40 °C e 50 °C. Após a incubação, os mesmos procedimentos descritos no item 4.9.3 para a secagem do material e medida da atividade residual de hidrólise foram realizados.

4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi feita em gel de poli(acrilamida segundo LAEMMLI (1970), usando o gel de empilhamento com 5% de poli(acrilamida (m/V) e o gel de separação com 12% de poli(acrilamida (m/V). As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (m/V) e descoradas com uma mistura de metanol: ácido acético: água (5/1/4, V/V/V). Para estimativa da massa molecular, foram utilizados os seguintes marcadores: β -galactosidase, 116 kDa, albumina soro bovina, 66,2 kDa, ovoalbumina, 45 kDa, lactato desidrogenase, 35 kDa, REase Bsp98, I, 25 kDa, β -lactoglobulina, 18 kDa,

lisozima, 14,4 kDa, (Fermentas Int., Burlington, Ontario, Canadá). As eletroforeses foram realizadas sob voltagem constante de 150 V. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min e submetidas à eletroforese, aplicando-se 10 µL de amostra.

4.10.2 Determinação da Concentração de Proteínas

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (1976) em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram pipetados 30 µL da amostra mais 170 µL do reagente de Bradford. A placa foi incubada 2 min à temperatura ambiente e absorbância das amostras foi medida a 595 nm. O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg de azul brilhante de Coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol a 95% (v/v), 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/v) e diluídos para 1 L de água destilada. Após dissolução, o corante foi filtrado através de papel filtro qualitativo. O padrão utilizado para as curvas de calibração foi soro albumina bovina (BSA, 0,2 mg mL⁻¹). As curvas de calibração foram feitas com concentrações entre 0,6 a 6 µg de proteína por poço. As amostras foram diluídas para terem absorbâncias correspondentes às absorbâncias obtidas na curva de calibração.

4.10.3 Determinação de Atividade Enzimática: Método Titulométrico

Foi realizada a caracterização da lipase Lip-LifC6G9 livre utilizando o método titulométrico (STUER, JAEGER e WINKLER, 1986), no equipamento pHStat (718 Stat Titrino, Metrohm), pela titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados a partir da hidrólise de triglicerídeos por 5 min a 30 °C, pH 7,5. Uma unidade de atividade enzimática é equivalente a 1 µmol de ácido graxo produzido na unidade de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para os testes de atividade, foram adicionadas alíquotas de 0,025 mg de proteína em 20 mL da emulsão.

4.10.4 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácido oleico durante as reações de síntese do oleato de etila e de hidrólise da trioleína em meio orgânico, e mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres (FIGURA 14) solúveis em fase orgânica. A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Para cada ensaio, foram adicionados 100 μL da amostra em *ependorfs* contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 μL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 1 min. A absorbância da fase orgânica é lida a 715 nm. A atividade enzimática é calculada a partir da velocidade inicial da reação, sendo o cálculo da atividade feito a partir do gráfico da porcentagem de conversão em éster na reação de esterificação ou de ácidos graxos na reação de hidrólise, em função do tempo, tomando-se a equação da reta tangente ao início da curva (partindo do ponto zero). Uma unidade de atividade de esterificação corresponde à quantidade de enzima que promove a síntese de 1 μmol de éster na unidade de tempo nas condições do experimento. Já para a reação de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional. Neste caso, uma unidade de atividade de hidrólise corresponde à quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo na unidade de tempo. A conversão em éster (%) foi determinada a partir da concentração de ácido graxo no meio.

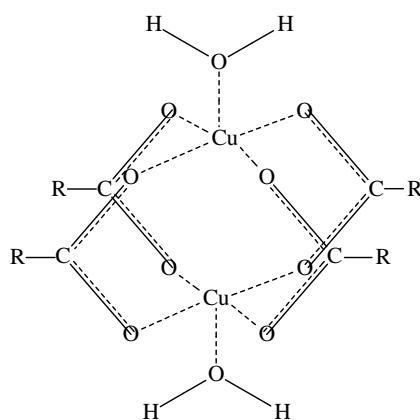


FIGURA 14- ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu^{2+} E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresentará a caracterização molecular e bioquímica das lipases de metagenômica LipC12 e LipC6G9, sendo dividido em duas partes. Primeiramente, serão apresentados os resultados da cristalização e determinação da estrutura cristalográfica de LipC12, que foi anteriormente clonada, purificada e caracterizada por GLOGAUER (2011). Posteriormente, serão apresentados os resultados de seleção de clones com atividade lipolítica, isolamento, clonagem, purificação, e caracterização da lipase LipC6G9, livre e imobilizada.

5.1 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA LIPASE LipC12

5.1.1 Superexpressão, Purificação e Cristalização de LipC12

LipC12 foi expressa e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Um eletroforegrama SDS-PAGE (FIGURA 15) mostra as frações eluídas da coluna de níquel durante a purificação da lipase e a análise do gel por densitometria mostrou que a lipase apresenta uma pureza de 98%. A massa molecular teórica esperada da proteína, conforme determinação pelo programa ProtParam (GASTEIGER *et al.* 2005), é de 33,9 kDa e pI de 6,45, o que foi confirmado pela análise eletroforese SDS-PAGE onde obteve-se 34,5 kDa (valor calculado). A seqüência de LipC12 é ilustrada na TABELA 8.

TABELA 8 - SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE LipC12

Lipase
LipC12
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSASSLKFP I VLVHGLLGFDKIGGIYPYFY GIKEALEKAGAKVYIATLSALNSNELRGEQLLEFVRKVQAETGAAKVNLI GHSQGPLACRYVAATHPELIASVTSVNGVNHGSEVADLVRLALTPGRLPE SIANAAMSAFGQLLSALAGSPRLPQSGIEALEALTSEGVAAFNNKYPQGL PAEWGGEGKELVNGVYYYYSWGSVIDYNPLHQGANNDPLHVAMLAFSILF TNERFQNDGLVGRYSSHLGKVI GSDYSMDHVDAINQLAGVVANNTDPVQL FVEHVARLKSGL*

Após a purificação, as amostras foram reunidas, dialisadas e concentradas para os ensaios de cristalização, que utilizou o método de difusão de vapor, conforme descrito na seção 4.4.1 (Pág 29). Dez semanas após o preparo das amostras, inúmeros cristais em forma de agulha foram observados para quase todas as condições estudadas e para as três concentrações de proteína; estes cristais, todavia, não permitiram uma coleta completa de dados de difração de raio X, com exceção de duas condições que propiciaram a formação de cristais maiores, embora de baixa resolução, que foram: (1) 10 mg mL⁻¹ de concentração de proteína em tampão 0,1 mol L⁻¹ de bis-Tris propano pH 7,0, com 2,0 mol L⁻¹ de formato de sódio; e (2) em tampão 0,1 mol L⁻¹ de bis-Tris propano pH 7,0 com 3,5 mol L⁻¹ de cloreto de amônio. A FIGURA 16 mostra os cristais obtidos nessas duas condições nas gotas de cristalização e em *cryoloop*.

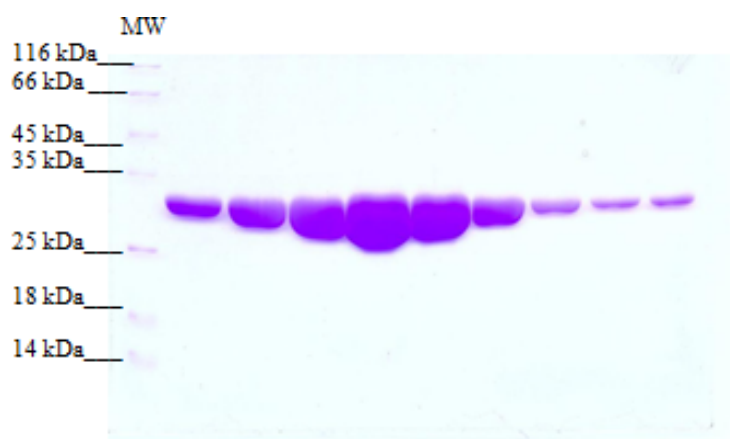


FIGURA 15 - ELETROFOREGRAMA SDS-PAGE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DE LIPC12 POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

Linha MW contém os marcadores de massa molecular: 116kDa, β -galactosidase, 66kDa, soro albumina bovina, 45kDa, ovoalbumina, 35kDa, lactato desidrogenase, 25kDa, REase Bsp98, I 18kDa, β -lactoglobulina, 14kDa, lisozima. As demais linhas são as frações de LipC12 purificada eluídas da coluna de níquel (Ni²⁺) (HisTrap™). Foram injetadas 10 μ L de proteína por linha.

Outras tentativas de coleta de dados mostraram que os demais cristais em forma de agulhas crescidos em diferentes condições possuíam a mesma cela unitária, isto é cela primitiva e tetragonal (P4). A repetição de várias unidades de celas unitárias que são empilhadas em três dimensões compõe um cristal (GIACOVAZZO, 1992).

Embora tenham sido coletados dois cristais (FIGURA 16), os dados estatísticos de coleta e refinamento a seguir apresentados são apenas do cristal

da FIGURA 16 D, que forneceu o conjunto de dados de difração completo. O cristal da FIGURA 16 C, não será apresentado, devido ao fato do eixo 4_1 cristalográfico ter ficado paralelo ao eixo de rotação, ocorrendo à formação de uma região cega de coleta, gerando um conjunto de dados de difração com lacunas, isto é, incompleto.

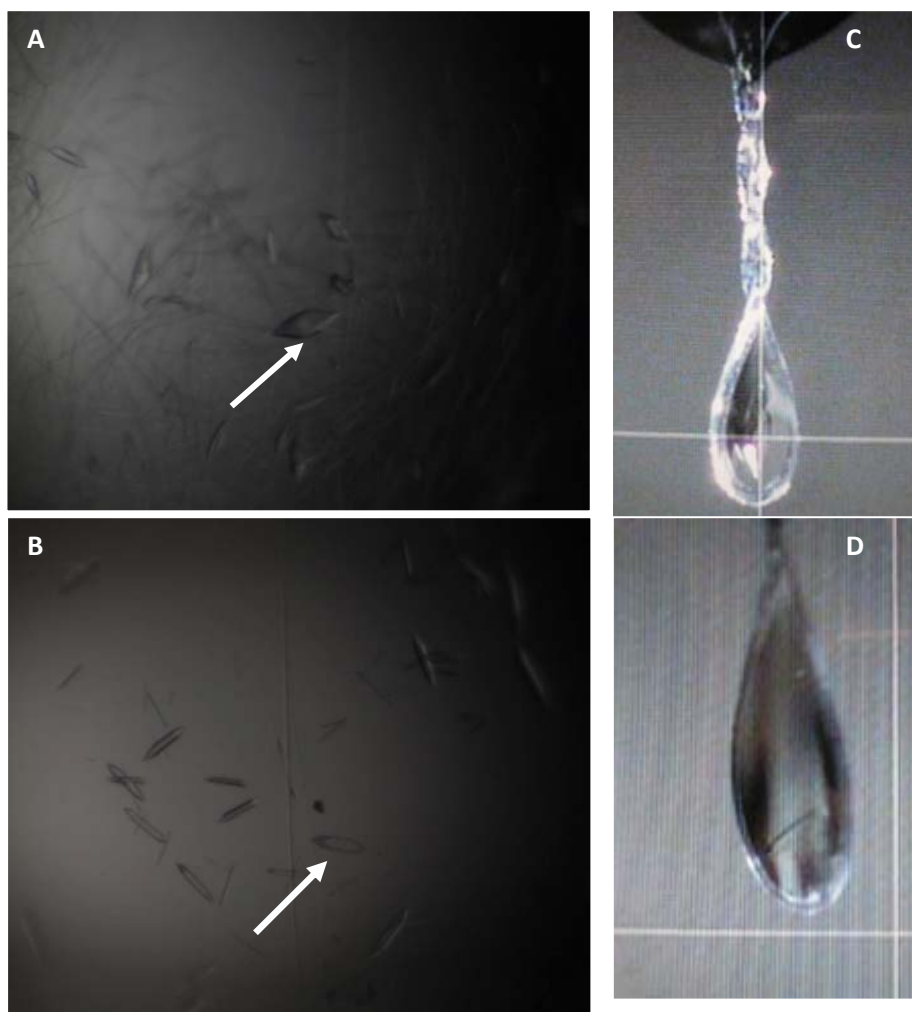


FIGURA 16 - CRISTAIS DA LIPASE LipC12 OBTIDOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO DE VAPOR. Método de difusão de vapor: solução insaturada de proteína é misturada com igual volume de solução precipitante (solução do reservatório-poço). A concentração da proteína aumenta conforme a água é perdida da gota para o reservatório rumo ao equilíbrio. Condição de cristalização (A): $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de formato de sódio e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão bis-Tris propano pH 7,0. Condição de cristalização (B): $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de amônio com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de bis-Tris propano pH 7,0. Cristais montados no *loop* na cabeça goniométrica do difratômetro são mostrados em (C) e (D).

5.1.2 Processamento dos Dados de Difração de Raio X e Substituição Molecular

O conjunto de dados referente ao cristal da FIGURA 16 D foi coletado a 2,7 Å de resolução, a 100 K de temperatura, com um valor de R_{sym}^1 de 7,2%. Os cristais de LipC12 pertencem ao grupo espacial tetragonal $P4_122$, com parâmetros de cela unitária $a = 58,62$ e $c = 192,60$ Å. A TABELA 9 mostra os dados cristalográficos e estatísticos da coleta.

A massa molecular calculada pelo programa ProtParam (GASTEIGER, 2005) do monômero de LipC12 com cauda His é de 33,4 kDa; assim, o parâmetro de empacotamento do cristal, calculado pela divisão de volume pela massa de proteína da unidade assimétrica, é $2,48 \text{ Å}^3/\text{Dalton}$ (MATTHEWS, 1968), com 50,4% de volume de solvente (água) para um simples monômero na unidade assimétrica.

TABELA 9 - DADOS DE COLETA E DADOS ESTATÍSTICOS DO PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PARA O CRISTAL DA LIPASE LipC12

Nº. de Cristais	1
Fonte de raios X	MicroMax-007 gerador de ânodo rotatório
Detector	R-Axis IV ⁺⁺
Temperatura dos dados de coleta /K	100
Grupo espacial	$P4_122$
Parâmetros de cela unitária / Å	$a = b = 58,62$, $c = 192,60$
Ângulo de oscilação / °	1
Distância do cristal ao detector / mm	179,82
Nº. de imagens	180
Tempo de exposição por imagem /s	1200
Comprimento de onda /Å	1,5418
Mosaicidade /°	0,12
Resolução /Å	193–2,70 (2,78–2,64)
Nº. reflexões observadas	127086 (9460)
Nº. de reflexões únicas	9471 (699)
Completeza /%	95,5 (85,5)
Redundância	3,5 (3,3)
R_{sym}^* /%	7,2 (40,4)
R_{meas} /%	13,3 (57,2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	24,27 (5,17)
Fator B do Wilson plot/ Å ²	47,3

Valores entre parênteses são para última faixa de maior resolução (2,78–2,64 Å). R_{sym} ou R_{merge} é a diferença entre as intensidades medidas relacionadas por simetria. Se as intensidades medidas são acuradamente reprodutíveis, R_{sym} é pequeno. Qualquer erro aleatório ou sistemático na medida das intensidades aumentará o R_{sym} . Esse índice determina a confiabilidade dos dados medidos. R_{meas} leva em consideração a redundância dos dados é o melhoramento estatístico da R_{sym} .

$$* R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_{h,i} - \langle I_h \rangle|}{\sum_h \sum_i I_{h,i}} \quad (\text{BLOW, 2003})$$

¹ R_{sym} é o erro médio de uma intensidade medida comparado à intensidade média, promediado sobre o grupo de reflexões escolhidas

Fases iniciais dos mapas de densidade eletrônica foram obtidas utilizando-se o método indireto de substituição molecular (BLOW, 2003). A estrutura de referência para substituição foi a da lipase de *Pseudomonas Aeruginosa* (PAL), que possui o código 1EX9, do PDB (*Protein Data Bank*), e que tem 47% de identidade e 73% de similaridade com a lipase LipC12 cristalizada.

LipC12 é a primeira lipase de metagenômica e a segunda lipase pertencente à família I.1 (mesma família a que pertence PAL) com estrutura tridimensional determinada; ademais, diferentemente de PAL, apresenta a conformação da tampa hidrofóbica *lid* fechada. A seguir, algumas comparações entre a estrutura de PAL e LipC12 foram realizadas a partir do refinamento da estrutura cristalográfica de LipC12.

5.1.3 Refinamento e o Modelo da Estrutura Cristalográfica de LipC12

A estrutura de LipC12 foi refinada e modelada com os programas Phenix (AFONINE, GROSSE-KUNSTLEVE, ADAMS, 2005) e Coot (EMSLEY e COWTAN, 2004). No programa Phenix, otimizaram-se os pesos relativos aos dados experimentais e restrições geométricas e a região para mascarar o solvente desordenado. Decidiu-se usar um único domínio para tensores de TLS compreendendo a cadeia polipeptídica como um corpo rígido mediante estudo feito no servidor TLSMD (PAINTER e MERRIT, 2006). Os índices residuais finais de refinamento são $R = 19,6\%$ e $R_{free} = 25,4\%$. O modelo cristalográfico final possui 293 resíduos de aminoácidos iniciado a partir do resíduo Ser⁴, 190 moléculas de águas estruturais e apresenta a tampa hidrofóbica *lid* na conformação fechada. Foi realizada uma busca por ligantes e íons na estrutura, entretanto, não se encontrou densidade eletrônica compatível com nenhum deles, mesmo para o íon cálcio no possível sítio de ligação deste. A estrutura foi validada e considerada satisfatória pelos programas Sfcheck (VAGUINE *et al.* 1999), Whatcheck (HOOFT *et al.* 1996), Procheck (LASKOWSKI *et al.* 1993) e Validation PDB (WESTBROOK *et al.* 2003).

O gráfico de Ramachandran (FIGURA 17) resultante da validação por Procheck revela que o modelo final apresenta-se excelente quanto aos ângulos

ϕ/ψ , com 90,2% dos resíduos presentes na região mais favorecida e 9,4% na região adicionalmente permitida. O único resíduo que se apresenta na região proibida é a serina catalítica (Ser⁸³), como já era esperado, por ser uma conformação típica para as lipases com o dobramento α/β hidrolase, assim como já relatado para a PAL (código PDB 1EX9), lipase com maior similaridade com a LipC12 e pertencente à mesma família I.1 de lipases bacterianas (NARDINI *et al.* 2000). Ressalte-se que na estrutura de LipC12, a densidade eletrônica observada corrobora essa conformação (FIGURA 18).

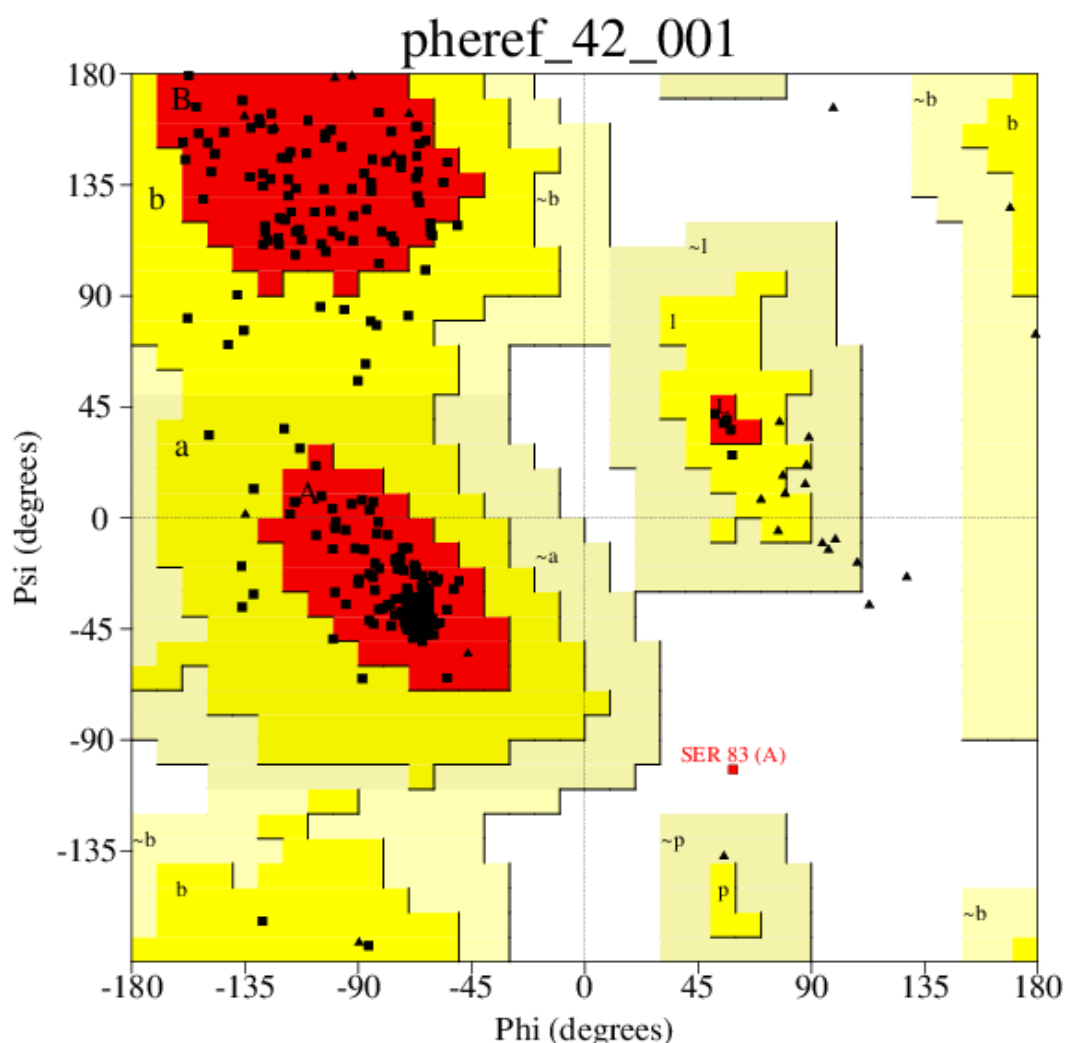


FIGURA 17 - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN OBTIDO PELO PROGRAMA PROCHECK (LASKOWSKI *et al.* 1993)
Região mais favorecida em cor vermelha, região adicionalmente favorecida em cor amarela, região generosamente favorecida em bege e região proibitiva em branco.

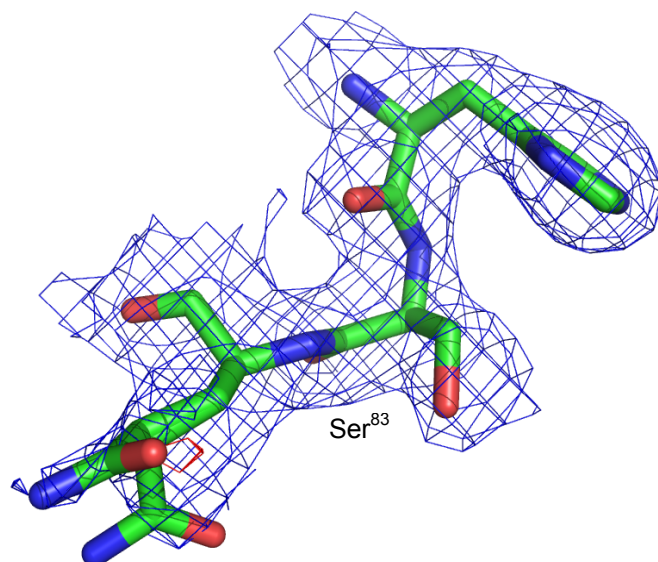


FIGURA 18- Ser⁸³ CATALÍTICA E SUA DENSIDADE ELETRÔNICA NA ESTRUTURA DE LipC12. O mapa de densidade eletrônica (azul) foi desenhado com contorno em 1σ , o mapa de Fourier diferença foi desenhado com contornos em $+3\sigma$ (verde) e -3σ (vermelho). Figura produzida pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

A FIGURA 19 mostra os índices RSR e RSCC obtidos pelo programa Mapman (KLEYWEGT e JONES 1996) para a estrutura de LipC12. Os valores médios para a estrutura são 0,134 e 0,945, para RSR e RSCC, respectivamente.

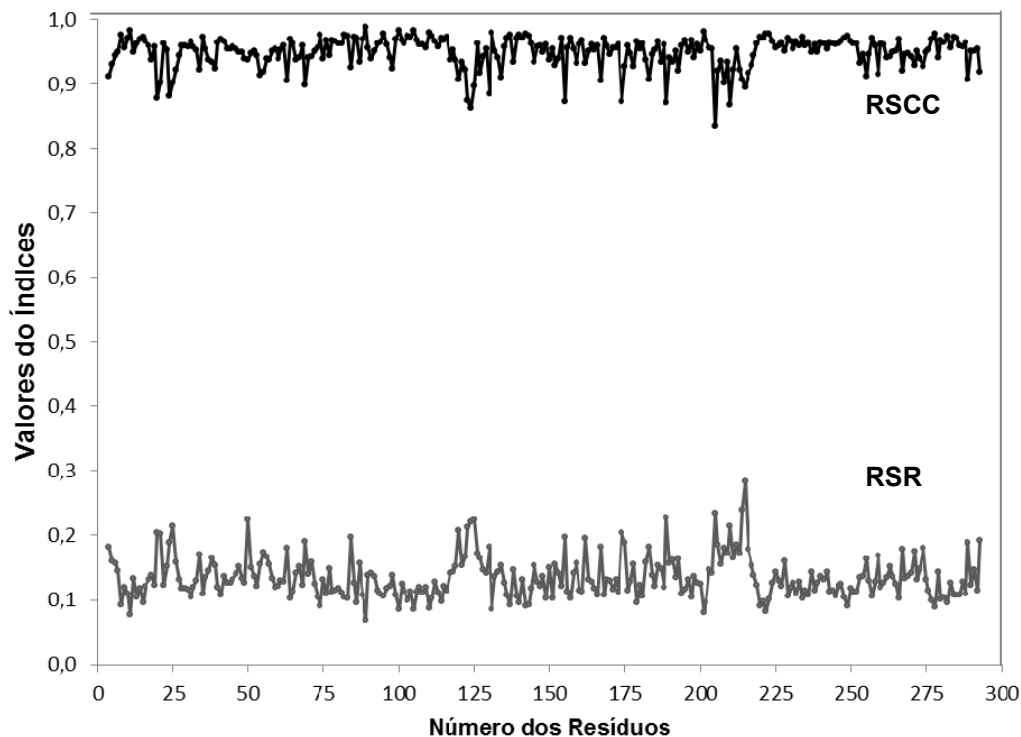


FIGURA 19- QUALIDADE DO AJUSTE NA DENSIDADE ELETRÔNICA PARA A ESTRUTURA LipC12. Os índices RSCC e RSR estão em cor preta e cinza, respectivamente, para cada resíduo apontado. Valores calculados com o programa Mapman (KLEYWEGT e JONES, 1996).

A estrutura cristalográfica de LipC12, assim como a de PAL, também apresenta uma ligação cis-peptídica, no caso da primeira, entre Gln²⁶⁶-Leu²⁶⁷ e no caso da segunda entre Gln²⁵⁷-Val²⁵⁸. A FIGURA 20 ilustra a estrutura de LipC12 e destaca a localização da ligação cis-peptídica. Essa ligação está próxima à His²⁶⁰ catalítica e a mantém em posição adequada à catálise, fazendo parte, ambos os resíduos, da região C-terminal da proteína. Além disso, é possível verificar, na FIGURA 21, que um dos resíduos aspartato conservados do sítio de ligação de cálcio, resíduo Asp²⁰⁹ para PAL e Asp²¹⁷ para LipC12, se apresenta em conformação diferente, provavelmente pela ausência deste íon nesta última. Já o resíduo aspartato, Asp²⁵³ para PAL e Asp²⁶² para LipC12, apresenta-se na mesma conformação nas duas proteínas e se localizam próximo a His catalítica e hélice α 9 (região C-terminal).

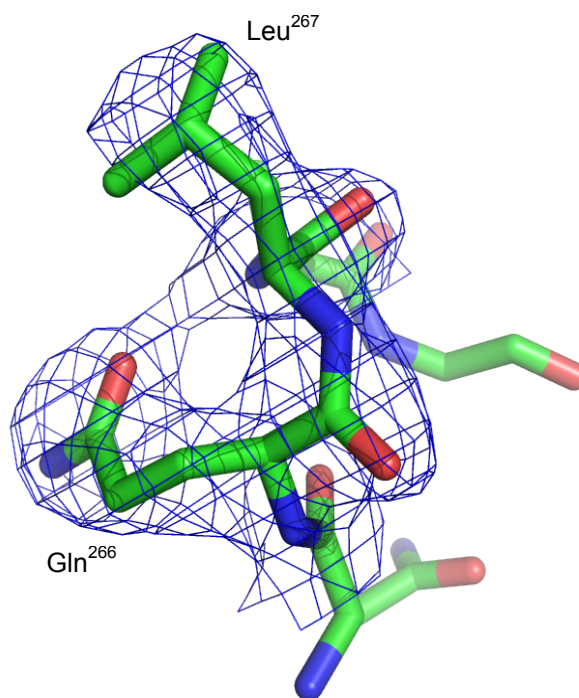


FIGURA 20 - LIGAÇÃO CIS-PEPTÍDICA ENTRE Gln²⁶⁶-Leu²⁶⁷ PRESENTE NA ESTRUTURA DE LipC12

O mapa de densidade eletrônica (azul) foi desenhado com contorno em 1σ , o mapa de Fourier diferença foi desenhado com contornos em $+3\sigma$ (verde) e -3σ (vermelho). Figura produzida pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

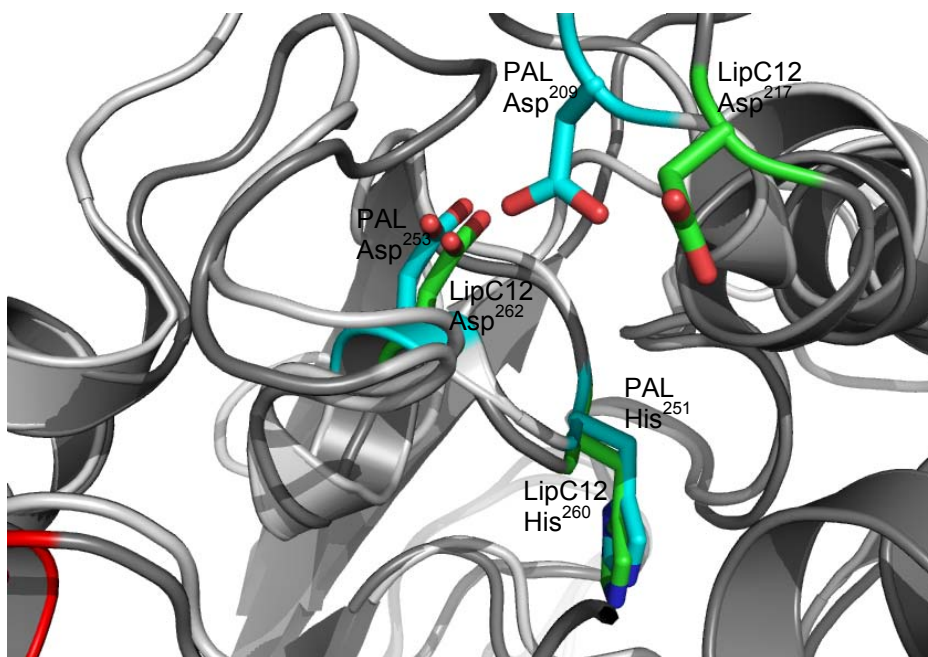


FIGURA 21 - PROVÁVEL SÍTIO DE LIGAÇÃO DE ÍON CÁLCIO, APRESENTANDO OS RESÍDUOS Asp²¹⁷ E Asp²⁶² PRÓXIMOS À His²⁶⁰ EM COR VERDE PARA A LipC12 E SEUS CORRESPONDENTES PARA A PAL (*Pseudomonas aeruginosa*) EM COR AZUL
Figura produzida pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

A estrutura global de LipC12 consiste em um domínio “core” (resíduos 4-108 e 163-293), mostrando as características típicas da topologia do dobramento α/β hidrolase (31-33, cor vermelha na FIGURA 22 A) e em um domínio “cap” (resíduos 109-162), com quatro α -hélices ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ em cor verde e $\alpha 8$ em cor cinza na FIGURA 22 A para LipC12 e $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ em cor azul para PAL na FIGURA 22 B). A FIGURA 22 B mostra o domínio cap, da estrutura de PAL sobreposta à LipC12 e a localização das hélices. A hélice $\alpha 5$ é a tampa hidrofóbica *lid*, em PAL na conformação aberta (em cor azul) e em LipC12 na conformação fechada (em cor verde). A maior similaridade entre as duas estruturas é no domínio *core*, enquanto as maiores diferenças estão na região correspondente às fitas- β b1 e b2 de PAL (ilustradas em rosa na FIGURA 22 B), ausentes em LipC12, além do domínio “cap”, que se encontra em uma conformação diferente.

A região N-terminal da estrutura de LipC12 começa com a folha $\beta 3$ (nomenclatura similar à utilizada por PAL, apresentada na FIGURA 22 A, na cor laranja) e a região C-terminal termina com a hélice $\alpha 9$ (cor azul) na FIGURA 22 A.

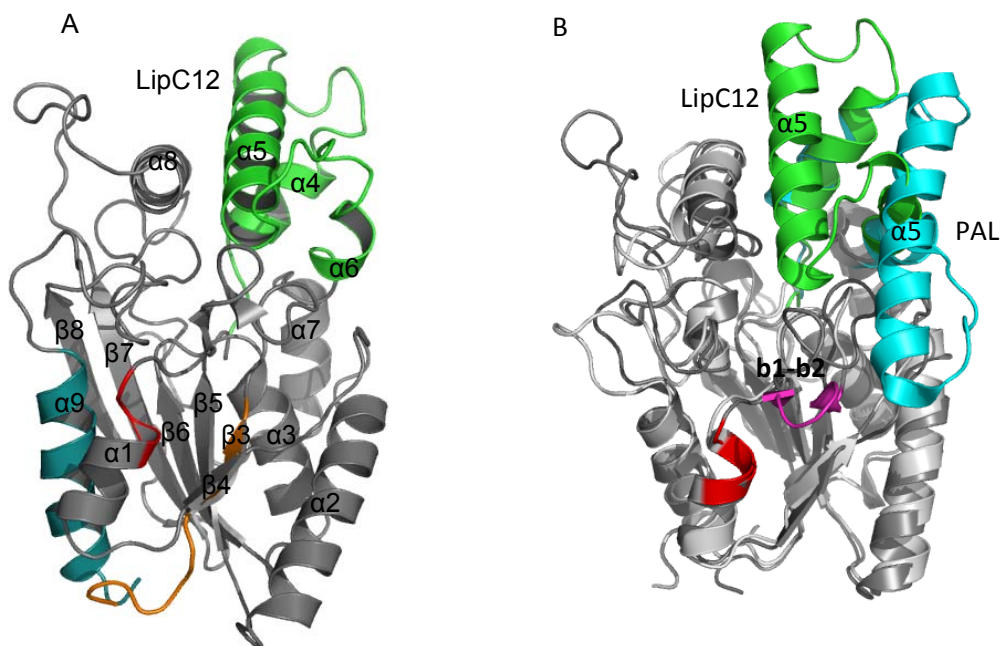


FIGURA 22– ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE (A) LipC12 E (B) LipC12 SOBREPOSTA À DE PAL [LIPASE DE *Pseudomonas aeruginosa* (CÓDIGO PDB 1EX9)]
Figuras produzidas pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

A FIGURA 23 apresenta a tríade catalítica de LipC12, Ser⁸³, Asp²³⁸ e His²⁶⁰ (na cor verde), sobreposta à tríade de PAL. A Ser⁸³ localiza-se entre a fita β5 e a hélice α3.

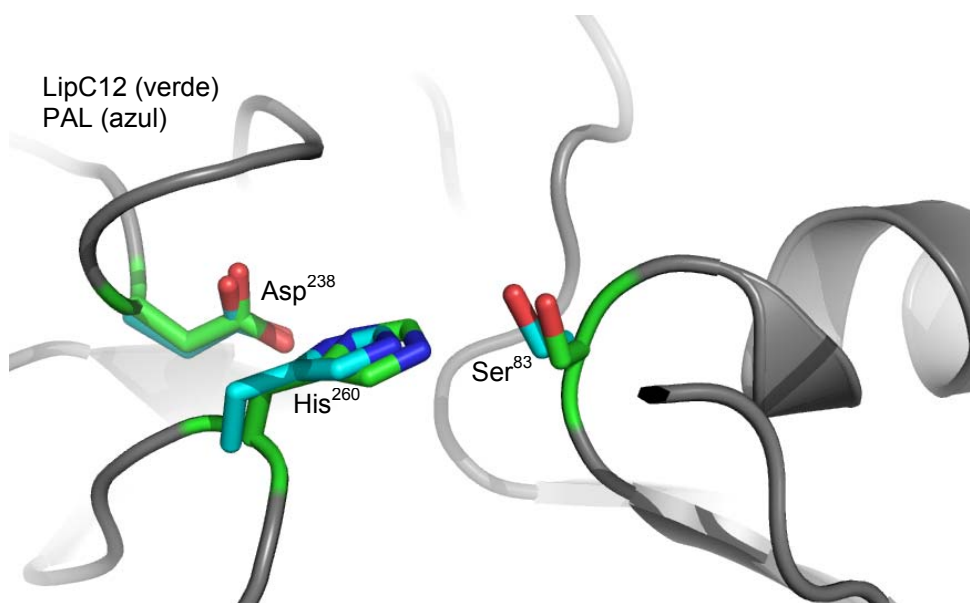


FIGURA 23 – TRÍADE CATALÍTICA DE LipC12, RESÍDUOS Ser⁸³, Asp²³⁸ e His²⁶⁰, SOBREPOSTA À DE PAL
Cor verde para LipC12 e cor azul para PAL [*Pseudomonas aeruginosa* (Ser⁸², Asp²²⁹ e His²⁵¹)].
Figura produzida pelo programa Pymol (DeLANO, 2002).

A cavidade catalítica da enzima contém vários resíduos hidrofóbicos e alguns hidrofílicos: Gly¹⁵, Leu¹⁶, Tyr²⁸, Gly⁸¹, His⁸², Ser⁸³ (catalítico), Val¹⁰⁹, Ser¹¹³, Val¹¹⁵, Ala¹¹⁶, Val¹¹⁹, Leu¹⁵³, Gly¹⁵⁷, Leu¹⁶¹, Ala¹⁶³, Ala²²², Asp²³⁸ (catalítico), Leu²⁴⁰, Val²⁴¹, His²⁶⁰ (catalítico), Val²⁶¹, Ile²⁶⁴. A sobreposição comparativa de LipC12 com a estrutura de PAL co-cristalizada com seu substrato sintético [ácido [(2*R*)-2,3-bis(octilcarbamoiloxi)propoxi]-octil-fosfínico, denominado pelo código PDB de OCP] permite algumas suposições. Como os resíduos Gly¹⁵ e Leu¹⁶ têm conformações diferentes em relação seus correspondentes (Gly¹⁵ e Met¹⁶) em PAL, esses resíduos devem ser importantes para permitir a entrada do substrato sintético no sítio catalítico da enzima e provavelmente estão também relacionados à abertura da tampa hidrofóbica. A FIGURA 24 A mostra a tentativa de modelar o resíduo Gly¹⁵ de LipC12 na mesma conformação que Gly¹⁵ de PAL, entretanto, os mapas de densidade eletrônica e de Fourier diferença indicam que esta posição não é correta; já a FIGURA 24 B mostra os mesmos mapas calculados após a modelagem e refinamento na posição correta. A sobreposição da estrutura da LipC12 com a de PAL com o substrato OCP mostra que o resíduo seguinte à Gly¹⁵, Leu¹⁶ em LipC12, ficaria em choque com a posição do ligante (FIGURA 25), enquanto que o correspondente de PAL, Met¹⁶, permite à acomodação do resíduo.

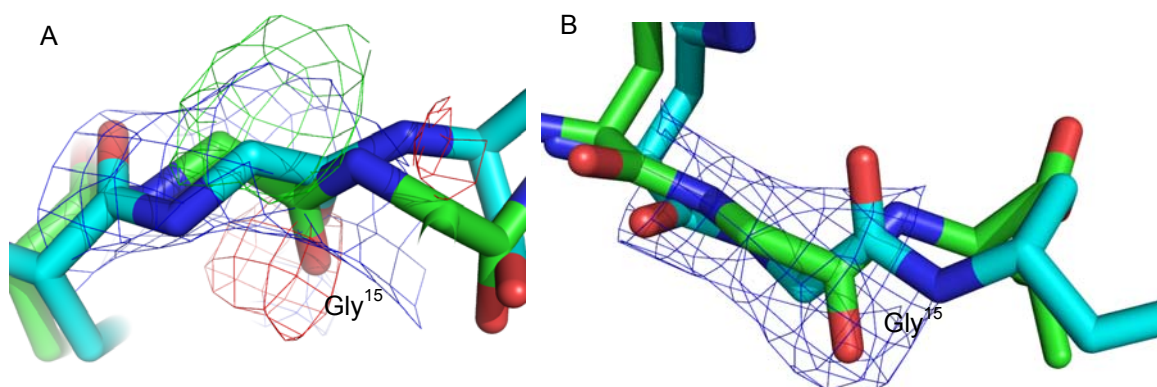


FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DA POSIÇÃO DE Gly¹⁵ ENTRE AS ESTRUTURAS DE LipC12 E PAL (*Pseudomonas aeruginosa*)

A cadeia polipeptídica de LipC12 é ilustrada em cor verde e a de PAL em cor azul. Em (A), a tentativa de posicionar o resíduo Gly¹⁵ da estrutura de LipC12 na mesma posição na estrutura de PAL. Em (B) Posição correta de Gly¹⁵ para LipC12. O mapa de densidade eletrônica (azul) foi desenhado com contorno em 1 σ , o mapa de Fourier diferença foi desenhado com contornos em +3 σ (verde) e -3 σ (vermelho). Figura produzida pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

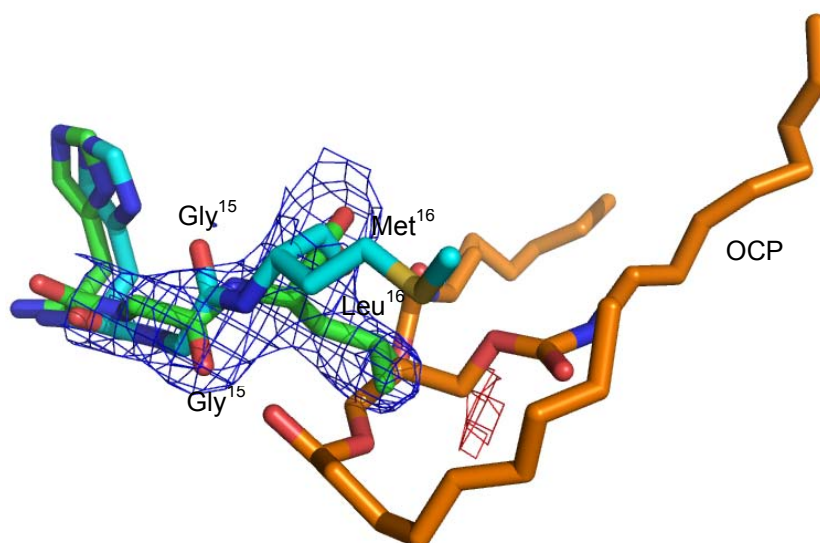


FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESÍDUOS Leu¹⁶ DE LipC12 E Met¹⁶ DE PAL (*Pseudomonas aeruginosa*)

A cadeia polipeptídica de LipC12 é ilustrada em cor verde e a de PAL em cor azul. O ligante sintético presente na estrutura de PAL OCP (ácido [(2R)-2,3-bis(octilcarbamoiloxy)propoxi]-octilfosfínico) é apresentado em cor laranja. O mapa de densidade eletrônica (azul) foi desenhado com contorno em 1σ , o mapa de Fourier diferença foi desenhado com contornos em $+3\sigma$ (verde) e -3σ (vermelho). Figura produzida pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

Geralmente lipases bacterianas da família I.2 apresentam dois resíduos de cisteínas que formam uma ponte dissulfeto, que é altamente conservada nesta família, mas não necessariamente conservada na família I.1. Este é o caso da LipC12, que apresenta os resíduos Trp¹⁸⁴ e Tyr²⁴⁴ correspondentes aos resíduos Cys¹⁸³-Cys²³⁵ (FIGURA 26 A) de PAL. LipC12 apresenta uma única Cys⁸⁹ (FIGURA 26 B) em sua estrutura, na hélice $\alpha 3$ próxima à serina catalítica. Essa diferença estrutural é bastante interessante, visto que mutações nesses resíduos em PAL realizadas por JAEGER e DIJKSTRA (1999) mostram que a lipase ficou mais sensível à desnaturação pelo aquecimento e à degradação proteolítica, sugerindo que a ponte dissulfeto estabiliza a molécula. Então, esse resultado sugere que talvez uma mutação nos resíduos Trp¹⁸⁴ e Tyr²⁴⁴ de LipC12 por duas cisteínas poderia aumentar a estabilidade térmica da enzima.

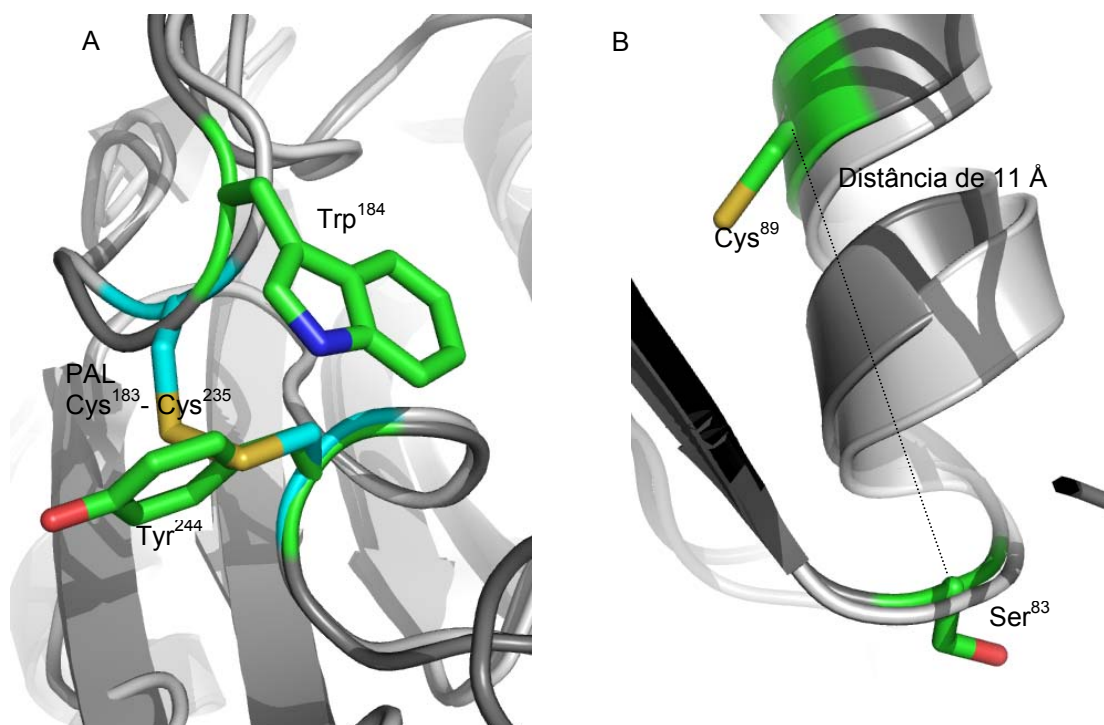


FIGURA 26 – COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE OS RESÍDUOS Trp¹⁸⁴ E Tyr²⁴⁴ DE LipC12 E Cys¹⁸³-Cys²³⁵ (PONTE DISSULFETO) DE PAL (*Pseudomonas aeruginosa*) (A) LipC12 apresenta os resíduos Trp¹⁸⁴ e Tyr²⁴⁴ (cor verde) na posição de uma ponte dissulfeto em PAL, resíduos Cys¹⁸³-Cys²³⁵ (cor azul). (B) LipC12 apresenta uma única cisteína, Cys⁸⁹, próxima a Ser⁸³. Figuras produzidas pelo programa PyMol (DeLANO, 2002).

LipC12 possui baixa identidade com lipases que já foram cristalizadas e se encontram depositadas no PDB (*Protein Data Bank*), a mais parecida apresenta 47% de identidade com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB code 1EX9, NARDINI *et al.* 2000), pertencente a família I.1 (lipases verdadeiras), segundo a classificação de lipases bacterianas realizadas por ARPIGNY e JAERGER (1999).

Embora inúmeras lipases tenham sua estrutura tridimensional determinada, nenhuma lipase de metagenômica foi elucidada até o momento. LipC12 é a primeira lipase de metagenômica cristalizada (MARTINI *et al.* 2012) e com estrutura tridimensional determinada no presente trabalho. A sua caracterização estrutural permitiu a verificação dos resíduos que compoem a fenda catalítica importante para especificidade da enzima frente a diferentes substratos e permitiu o conhecimento de um possível sítio de mutação genética que pode promover o melhoramento deste biocatalisador, podendo tornar-se mais eficiente (estável), por exemplo, para aplicações que requerem uma maior temperatura.

5.2 SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA SCGA

5.2.1 Triagem de Atividade Lipolítica Utilizando Métodos de Alto Desempenho

Os 127 clones com atividade hidrolítica da biblioteca SCGA, identificados anteriormente por GLOGAUER (2011), foram repicados nas placas de Petri com meios seletivos contendo tributirina, tricaprilina ou trioleína e incubados em estufa a 37 °C por 7 dias. A FIGURA 27 mostra vários clones com halo de hidrólise no meio seletivo com substrato trioleína. Os clones *lipC6-lifC6* e *lipG9-lifG9* apresentam halo de hidrólise nesse meio, e, portanto, os genes poderiam codificar uma lipase verdadeira (VERGER, 1997). Porém, o clone *estD12-lifD12* apresentou halo de hidrólise somente para os meios contendo os substratos tricaprilina e tributirina, o que sugere que *estD12-lifD12* possivelmente codifica para uma esterase, uma vez que não houve hidrólise do meio seletivo com o substrato trioleína (FIGURA 27).

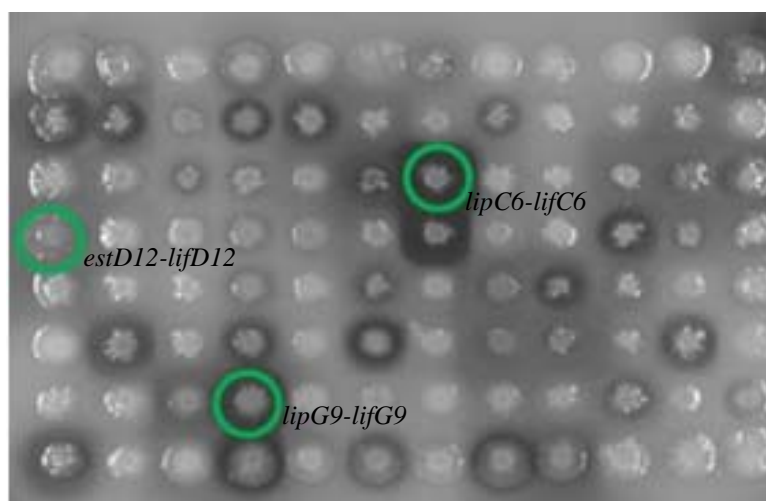


FIGURA 27 – ATIVIDADE DE DIFERENTES CLONES EM PLACAS CONTENDO TRIOLEÍNA
Meio: peptona 5 g L⁻¹, extrato de levedura 3 g L⁻¹, ágar 13 g L⁻¹ e (1% V/V) e trioleína. A atividade pode ser visualizada pelos halos transparentes ao redor das colônias. Os círculos em verde são os clones selecionados para o seqüenciamento: *lipC6-lifC6*, *estD12-lifD12* E *lipG9-lifG9*.

Três clones foram selecionados para aumentar as chances de se obter uma nova lipase ou esterase, pois havia a possibilidade de encontrar uma enzima já estudada ou conhecida.

5.2.2 Seqüenciamento e Identificação dos Genes *lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* e *estD12-lifD12*

Os clones *lipC6-lifC6*, *lipG9-lifG9* e *estD12-lifD12* foram seqüenciados pela técnica de transposon e editados com o programa PHRED (ERWING & GREEN, 1998). As seqüências-consenso (*contigs*) obtidas foram montadas no programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA), analisadas e comparadas às seqüências contidas no banco de dados NCBI, usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997). Estas análises demonstraram que os clones *lipC6-lifC6* e *lipG9-lifG9*, embora originados de fosmídeos diferentes, possuíam a mesma seqüência do gene da lipase. Todas as seqüências dos clones *lipC6-lifC6* e *lipG9-lifG9* foram unidas e convertidas numa seqüência-consenso única, denominada no presente trabalho de *lipC6G9-lifC6G9*.

Pelo seqüenciamento por transposon² foi possível identificar o gene da foldase (*lif*) associado ao gene da lipase (*lipC6G9*) e da esterase (*estD12*). Os genes *lipC6G9* e *lifD12* encontram-se no mesmo *operon* que *lipC6G9* e *estD12*, e estão localizados na região à montante dos genes *lipC6G9* e *lifD12*, respectivamente (FIGURA 28). Esses resultados são similares aos relatados na literatura para as lipases bacterianas com mecanismo de secreção tipo Sec ou tipo II que possuem a foldase, sendo essa auxiliadora na exportação da lipase em sua conformação ativa. Lipases de *Pseudomonas sp* e *Burkholderia sp* possuem a mesma localização genética da foldase em seus organismos de origem (WILHELM *et al.* 2007; ROSENAU, TOMMASSEN AND JAEGER, 2004; JAEGER, DIJKSTRA AND REETZ, 1999).



FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS GENES DA LIPASE (*lip*) OU DA ESTERASE (*est*) E SUAS FOLDASES (*lif*)

² Por transposon, os clones (plasmídeos com insertos contendo gene da enzima) selecionados são submetidos à mutagênese aleatória, fazendo uso de um sistema de inserção *in vitro* (kit Epicentre EZ-Tn5™) do transposon, que identifica os genes positivos pela inibição da atividade nos clones antes com atividade. Os produtos de inserção podem ser seqüenciados a partir de iniciadores que hibridizam nas extremidades do transposon. Podem ser identificados não somente o gene de interesse, como também genes a eles associados.

As seqüências-consensos (*contig*) de *estD12-lifD12* e de *lipC6G9-lifC6G9* foram submetidas à análise “*in silico*” pelo programa BLASTX (ALTSCHUL *et al.* 1997). Uma região do *contig* ORF ou ORP identificou o gene para uma esterase (*estD12*) com 918 bases de nucleotídeos (codificando 306 aminoácidos, TABELA 10) e o gene para a sua foldase (*lifD12*) com 882 bases de nucleotídeos (codificando 294 áminoácidos, TABELA 10); o primeiro apresentou 68% de identidade com a esterase de *Chromobacterium violaceum* e o segundo, 41% de identidade com a foldase do mesmo microrganismo. Para *lipC6G9-lifC6G9*, uma ORF (na região do *contig*) identificou o gene para uma lipase (*lipC6G9*) com 921 bases de nucleotídeos (codificando 307 aminoácidos, TABELA 10) e o gene para a sua foldase (*lifC6G9*) com 723 bases nucleotídeos (codificando 241 aminoácidos, TABELA 10). O primeiro apresentou 96% de identidade com a lipase de *Aeromonas veronii* B565, e o segundo, 77% de identidade com a foldase do mesmo microrganismo.

TABELA 10 - SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS GENES SELECIONADOS E SEQÜENCIADOS

Lipase/Esterase	Foldases
LipC6G9	LifC6G9
<u>MLMMKRWLLVLLCTLPMLAHASGYTQTRYPIVLVHGLFGFDKLLGVDFYFQVPAQLRAGGAKVYVAQVSATASSEQRGEQLLAQIELLLAATGAEKVNLIHSHGGPTIRYVASVAPELVASATSVGGVNYGSDIADLVRTNAAPGSAAEKLA AAAAHALSGVISLLSGGSQLPQDPVAA LDALTSKGANQFNQRYPEGLPSQYCGEGPM RATNGVYFWSWGRGNMTNILDVPDPALAL TGTFKEPN DGLVGVCSHLGKVI GTDYRM NHLDEVNQSF GIHHLFETDPVTLYRDHAHR LKELGL*</u>	<u>MRIVTLLAVPCAIALLLGGVLLWPAAPT AQVARQQGVPAASNHHHDPVQEAADELQERYR TFISAQSSLTVPDITLASLQILFDEREQL RQQSFTPAEQEQLFAEDRLMEQWTLRRKAL AEASDADKKALASELELWLAAQPQWFQEAE ANGRLLGELQALEQMEPARRDVILLEKAGP EAVDRLHQLEQDRQDSRSSSM AIWPSWGSY PPQPEPNSNRSCWPAGSSHSSGDGSKRSPG*</u>
EstD12	LifD12
<u>MKRLTLWF TVLLLVFSGMATADDYTRTRYPIVLVHGLFGFDTELGVDFYFQVPAQLRAGG AQVFVAQVSAANSNEKRGEQLLAEVERITA MTGARKVNLIHSGGGPTIRYVASVRPDLV ASVTSVGGVNGGSRVADLV RVVAPPGSTAE AIASKIAGWLAGLIGGLSGHPGLPQTPTAA LD SLT TAGTQRFNQAFPEGVPAARCGEGAY SVNGVRYYSWGS TSPLTNILDPLDGALGLL GSLHGEANDGLVSRCSHLGQVIKDDYRMN HVDEINQSFGLVSWFEVNPVTLYRQHANRL KQAGL*</u>	<u>MRWAGIVFIIVVSLMVTGYVMPD SGEDSSL TPAPVRSQQGTEADGSVHSLQGGLRTDEGL RRLFDYYLASLGERSLVATRAALAEQLSRT LDPNRTQSALALFDRYLG YRRALTTLAAPD HTPAAQLAAMRRLRKHYFSDAEAQGLFGTE DRYNDFTLALAAVRADTSLDAATRNRQIAE LEAALPEDLREARRAPVAHLALAAAREQALR EQGGNEEDLYRLRSQAVGQAGADRLADLDQ RNAAWQNRIHDWRAEQARLNADSSLTPPER EAALARYVSEHFDERERRRLAAF*</u>

*A seqüência em negrito refere-se à região deletada.

5.2.3 Desenho dos Primers para os Genes *estD12-lifD12* e *lipC6G9-lifC6G9*

Para obtenção da enzima para sua superexpressão, purificação e caracterização, *primers*³ foram desenhados para os genes inteiros e genes truncados das enzimas (lipase ou esterase) e suas foldases específicas *estD12-lifD12* e *lipC6G9-lifC6G9*, de modo garantir o sucesso nas clonagens e na obtenção das enzimas ativas, visto que sem suas foldases específicas elas poderiam apresentar-se inativas. A TABELA 10 mostra os aminoácidos deletados sublinhados, a partir dos *primers* truncados desenhados para a obtenção da enzima a partir do último aminoácido sublinhado. As regiões em que os aminoácidos são sublinhados na TABELA 10 para as quatro proteínas são de grande hidrofobicidade. Para o desenho dos *primers* truncados, as previsões de corte foram determinadas através dos programas de bioinformática TMHMM Server, SignalP (BENDTSEN *et al.* 2004) e ProtScale (GASTEIGER *et al.* 2005). O programa TMHMM Server realizou a predição das hélices trans-membranas para *lifC6G9* e *lifD12*; o programa SignalP, fez a predição da presença de sítios de clivagem de peptídeos-sinal na sequência de aminoácidos das enzimas *lipC6G9* e *estD12*. O programa ProtScale apresentou um valor numérico de hidrofobicidade elevado para os resíduos iniciais nas estruturas primárias de todas as proteínas.

Os resultados gerados a partir dos programas de bioinformática (resíduos sublinhados na TABELA 10) estão de acordo com dados da literatura para algumas lipases bacterianas, que descrevem uma região N-terminal hidrofóbica para lipases e foldases. No caso da lipase, esta região pode caracterizar uma região de peptídeo sinal; no caso da foldase, pode caracterizar uma α -hélice que se acopla à região trans-membrana no seu organismo de origem, auxiliando na translocação da lipase, exportando-a nativa e sem sua região N-terminal, devido à clivagem de seu peptídeo sinal (PAUWELS *et al.* 2006, ROSENAU *et al.* 2004, KHATTABI *et al.* 2000).

Embora *primers* tenham sido desenhados para ambas as enzimas (*lipC6G9* e *estD12*) e suas correspondentes foldases (*lifC6G9* e *lifD12*), foi realizada a

³ *Primers*: pequenos oligômeros

clonagem apenas para *lipC6G9* e *lifC6G9*, pois ao contrário de *estD12* e *lifD12*, esta apresentou halo de hidrólise em meio seletivo com trioleína como anteriormente relatado no item 5.2.1. Serão, portanto, apresentados apenas os resultados referentes à obtenção da lipase (LipC6G9) ativa.

5.3 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA LIPASE LipC6G9 E DE SUA FOLDASE LifC6G9

5.3.1 Amplificação, Ligação e Clonagem dos Genes *lipC6G9* e *lifC6G9*

Os genes de *lipC6G9* e *lifC6G9* inteiros e truncados foram amplificados por PCR para a clonagem nos vetores pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7. A FIGURA 29 confirma os insertos para a lipase e foldase em gel de agarose, com aproximadamente 1000 pb para os genes inteiros e aproximadamente 750 pb para os genes N-truncados. Após a amplificação, os insertos foram purificados, cortados com as enzimas NdeI e HindIII e repurificados. Os vetores pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7 foram linearizados com as enzimas de restrição NdeI e HindIII, ligados e clonados em *E. coli* Top10 e posteriormente em *E. coli* BL21 (DE3).

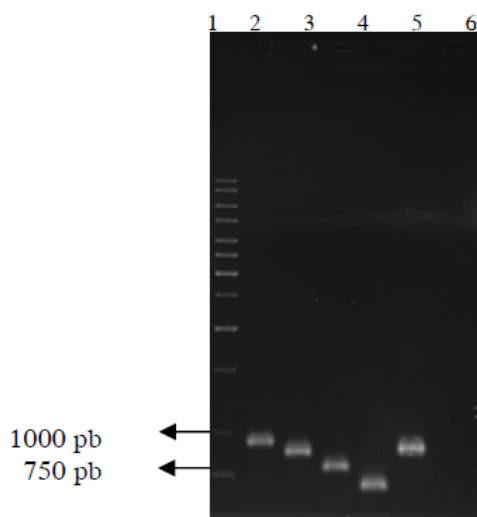


FIGURA 29 - ELETROFOREGRAMA EM GEL DE AGAROSE DOS GENES *lipC6G9* E *lifC6G9* AMPLIFICADOS POR PCR

Linha 1: marcadores de DNA de 1kb; linha 2: *lipC6G9* inteiro para pET29b(+); linha 3: *lipC6G9* N-truncado para pET29b(+); linha 4: *lifC6G9* inteiro para pT7-7; linha 5: *lifC6G9* N-truncado para pT7-7; linha 6: *lipC6G9* N-truncada para pET28a(+).

Os clones cujo inserto foi ligado ao vetor de clonagem específico foram confirmados por eletroforese em gel de agarose, sendo realizada uma mini-preparação de extração plasmidial (Miniprep) segundo SAMBROOK *et al.* (1989). A partir do padrão de corrida no gel de eletroforese em agarose (FIGURA 30 A), é possível diferenciar os “possíveis clones” (isto é, com inserto ligado ao vetor) e os vetores sem inserto. O inserto ligado ao vetor possui um padrão de corrida diferencial, isto é, ele é mais denso; então, o padrão de corrida no gel de agarose fica levemente acima do vetor não clonado (setas vermelhas na FIGURA 30 A indicam os “possíveis clones”).

Além disso, os “possíveis clones” com padrão de corrida diferencial foram re-confirmados após a restrição com as enzimas *Xba*I e *Hind*III (FIGURA 30 B), sendo liberados os fragmentos do vetor pT7-7 (círculo amarelo na FIGURA 30 B) e o inserto *lifC6G9* inteiro (círculo verde na FIGURA 30 B). O mesmo procedimento foi realizado para as demais construções (TABELA 6, Pag. 38).

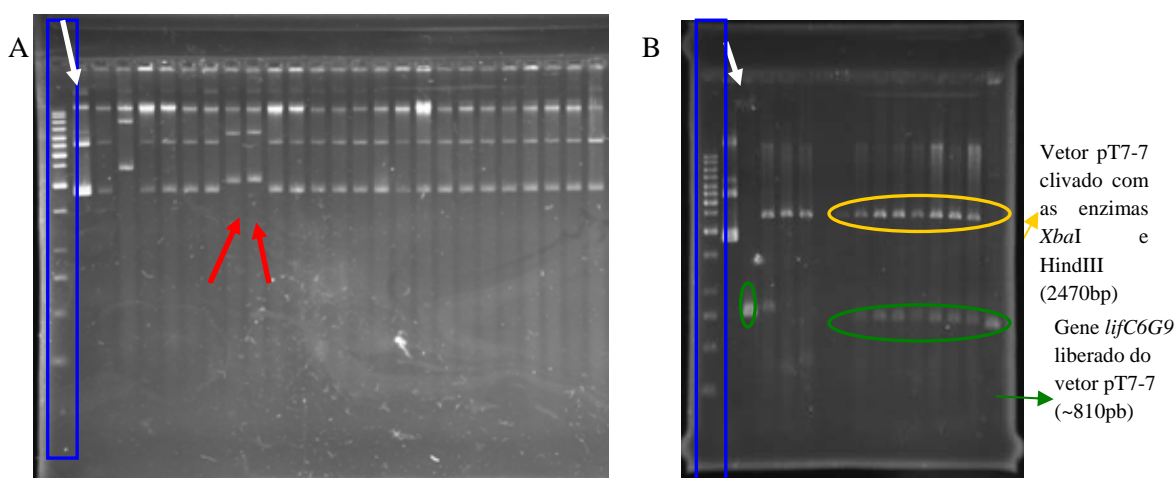


FIGURA 30 - ELETROFOREGRAMA EM GEL DE AGAROSE 1% PARA O CLONE pT7-7-*lifC6G9* inteiro

O retângulo azul: linha do marcador de DNA de 1 kb. Seta branca: migração do vetor pT7-7 fechado. Círculo amarelo: vetor pT7-7. Círculo verde: inserto *lifC6G9*.

Todas as seis construções nos respectivos vetores foram novamente seqüenciadas e confirmadas com a ajuda do programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Esse seqüenciamento confirmou

que os insertos clonados nos vetores possuíam um quadro de leitura de códons corretos, algumas vezes referenciado como “seqüência em *frame*”.

5.3.2 Testes de Expressão das Proteínas LipC6G9 e LifC6G9

Foram preparados géis de poliacrilamida SDS-PAGE para todas as 6 construções (TABELA 6, Pag. 38) e esses confirmaram a expressão das proteínas LipC6G9 e LifC6G9. A FIGURA 31 apresenta a banda de expressão, após indução com IPTG, de pET28a(+)-*lipC6G6trunc* (linha 2) e pT7-7-*lifC6G9trunc* (linha 3). Além disso, após expressão, sonicação e centrifugação da amostra, foi possível verificar que a lipase, em todas as construções, permaneceu na fração insolúvel (como corpos de inclusão, FIGURA 31, linha 6), enquanto a foldase inteira (pT7-7-*lifC6G9int*) expressou parcialmente solúvel e a foldase N-truncada (pT7-7-*lifC6G9trunc*) ficou na fração solúvel.

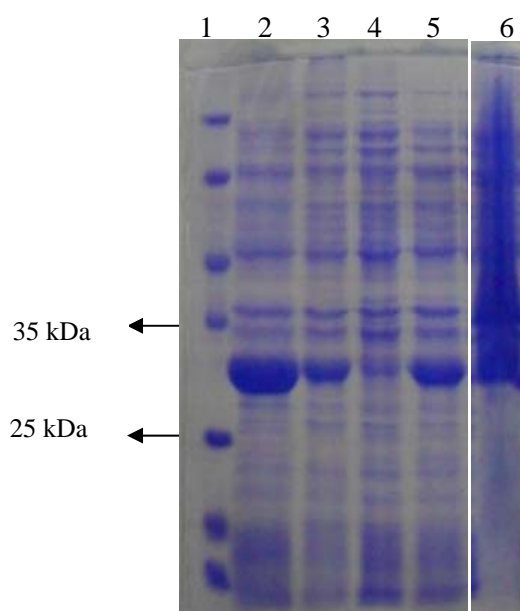


FIGURA 31 - ELETROFOREGRAMA SDS-PAGE PARA EXPRESSÃO DA LIPASE LipC6G9 e DA FOLDASE LifC6G9 e DA CO-EXPRESSÃO Lip-LifC6G9

Linhas: 1) marcadores de massa molecular (MW): 116kDa, β -galactosidase, 66kDa, albumina soro bovina, 45kDa, ovoalbumina, 35kDa, lactato desidrogenase, 25kDa, REase Bsp98, I 18kDa, β -lactoglobulina, 14kDa, lisozima, respectivamente; 2) Extrato bruto da expressão pET28b(+)-*lipC6G6trunc* (pós IPTG); 3) Extrato bruto da expressão pT7-7-*lifC6G9trunc* (pós IPTG); 4) Extrato bruto da co-expressão pET28b(+)-*lipC6G6trunc* com pT7-7-*lifC6G9trunc* (sem IPTG); 5) Extrato bruto da co-expressão pET28b(+)-*lipC6G6trunc* com pT7-7-*lifC6G9trunc* (com IPTG); 6) Insolúvel pET28b(+)-*lipC6G6trunc*.

⁴ *open read frame* ou seqüência de leitura aberta

O fato de a lipase permanecer na fração insolúvel evidencia a importância da presença da foldase juntamente com a lipase, uma vez que ela auxilia no seu dobramento correto e conseqüentemente pode diminuir a formação de corpos de inclusão. Foram, então, realizadas as co-expressões da lipase com a foldase para as oito diferentes combinações de co-expressão (TABELA 7, Pag. 39). A FIGURA 31, (linha 5), mostra a co-expressão de pET28a(+)-*lipC6G6trunc* com pT7-7-*lifC6G9trunc*. Embora não tenha sido possível verificar as bandas de expressões individuais para a lipase e foldase separadas, pois elas têm massas moleculares muito próximas, visualizou-se uma banda única de expressão, sendo que o mesmo ocorreu para as demais co-expressões testadas. Portanto, foram realizados testes de atividade de hidrólise para as oito combinações de co-expressão, conforme descrito a seguir.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA AS EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 ISOLADA E CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 COM A FOLDASE LifC6G9

A atividade das diferentes expressões e co-expressões de LipC6G9 e LifC6G9 em *E. coli* BL21 DE3 foi determinada nos extratos brutos pelo método titulométrico (TABELA 11) (STUER, JAEGER e WINKLER, 1986). Não foi detectada atividade para a expressão da lipase isolada, como já era esperado, devido à ausência da foldase e de uma maquinaria de secreção na estirpe BL21 (DE3), como observado anteriormente por AKRIM *et al.* (1993). A formação de corpos de inclusão causada pela ausência da foldase também foi observada para lipases de *Pseudomonas* sp. (ROSENAU; JAEGER, 2000) e de *Burkholderia* sp (PAUWELS *et al.* 2008, 2006, 2005, KHATTABI *et al.* 2000).

As co-expressões numeradas na TABELA 11 como 3.6 e 4.5, correspondentes a pET28a(+)-*lipC6G9trunc* com pT7-7-*lifC6G9trunc* e pET28a(+)-*lipC6G9int* com pT7-7-*lifC6G9int*, apresentaram atividades específicas mais altas (10,7 e 11,9 U mg⁻¹, respectivamente). Destas, foi selecionada a co-expressão 3.6, que será denominada a partir daqui de Lip-LifC6G9, para a purificação e caracterização. A escolha desta co-expressão ocorreu por dois fatores: primeiramente, o extrato bruto dessa co-expressão apresentou uma elevada atividade (10,7 ± 0,6 U mg⁻¹,)

comparada às demais co-expressões, embora não a maior. Em segundo lugar, as duas proteínas truncadas mimetizam o mecanismo de secreção para microrganismo de homologia similar, *Aeromonas sp* (PEMBERTON *et al.* 1997); isto é, as proteínas foldase e lipase *in vivo* geralmente apresentam uma região N-terminal rica em resíduos hidrofóbicos, que, no caso da foldase, caracteriza uma alfa-hélice acoplada na região trans-membrana da célula viva, e na lipase, caracteriza um peptídeo sinal, que é perdido ao ser translocada para fora da célula ativa. Esse mecanismo está presente em lipases de *B. glumae* (PAUWELS *et al.* 2006; KHATTABI *et al.* 2000), *Pseudomonas sp* (WILHELM *et al.* 2007; ROSENAU, TOMMASSEN e JAEGER, 2004) e *Aeromonas sp.* (PEMBERTON *et al.* 1997). Assim sendo, os 33 e 25 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal para lipase e foldase, respectivamente, são dispensáveis para ambas as proteínas, pois não contribuem para o enovelamento e ativação da lipase. Além disso, a retirada dos resíduos hidrofóbicos diminui a possibilidade de agregação da enzima através de interações hidrofóbicas, que pode resultar na diminuição da atividade, e, conseqüentemente, diminuir o rendimento da enzima purificada, como relatado por VELU, NANDHINIDEVI, GAUTAM (2012) para a lipase de *Aeromonas caviae* AU04

TABELA 11 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS CO-EXPRESSÕES DA LIPASE LipC6G9 E DE SUA FOLDASE (LifC6G9) ANTES DA PURIFICAÇÃO

Co-expressões (denominações numeradas na coluna à direita)		Atividade* (U mg ⁻¹)	
pET29b(+)-lipC6G9int	pT7-7-lifC6G9int	1.5	0
pET29b(+)-lipC6G9int	pT7-7-lifC6G9trunc	1.6	0
pET29b(+)-lipC6G9trunc	pT7-7-lifC6G9int	2.5	0
pET29b(+)-lipC6G9trunc	pT7-7-lifC6G9trunc	2.6	0
pET28a(+)-lipC6G9trunc	pT7-7-lifC6G9int	3.5	1,4 ± 0,1
pET28a(+)-lipC6G9trunc	pT7-7-lifC6G9trunc	3.6	10,7 ± 0,6
pET28a(+)-lipC6G9int	pT7-7-lifC6G9int	4.5	11,9 ± 0,1
pET28a(+)-lipC6G9int	pT7-7-lifC6G9trunc	4.6	1,6 ± 0,3

*Determinações de atividade realizadas em triplicata para o extrato bruto.

Método titulométrico em pHStat, substrato tricaprilina, 30 °C, pH 7,5.

As co-expressões 1.5, 1.6, 2.5 e 2.6 (TABELA 11) referentes à clonagem de LipC6G9 no vetor pET29b(+) não apresentaram atividade, provavelmente devido à presença da cauda His na extremidade C-terminal, que pode comprometer o sítio ativo desta lipase. De acordo com PAUWELS *et al.* 2006 e NARDINI *et al.*

2000, em lipases de *B. glumae* e *P. aeruginosa* dois resíduos componentes da tríade catalítica - Asp e His - estão localizados na região C-terminal destas enzimas. LIU, SCHMID e RUSNAK (2006) também observaram uma diminuição da atividade da lipase B de *C. antartica* (CalB) clonada com cauda His C-terminal. Além disso, segundo PENG *et al.* (2011), lipases possuem na região C-terminal o dobramento α/β hidrolase conservado, e uma mudança pode conferir uma conformação desfavorável divergente da enzima nativa, e assim comprometer o seu desempenho catalítico. KOJIMA *et al.* (2003) examinaram o efeito da deleção da região C-terminal na lipase de CalB, desenhando mutantes onde, nesta região, foram truncados nos resíduos finais 605, 558, 502 e 392. Os mutantes com cortes nos resíduos 605 e 558 apresentaram baixa atividade, e os com cortes em 502 e 392 não apresentaram atividade. KOHNO *et al.* (2001), com a substituição de aminoácidos na região C-terminal, melhoraram a temperatura ótima para a atividade da lipase de *Rhizopus niveus*. HUNG *et al.* (2011) construíram uma quimera⁵ a partir de duas lipases (LIP1 e LIP4) de *Candida rugosa*, trocando os resíduos da região C-terminal de LIP1 pelos de LIP4 e adicionando uma glicosilação, o que resultou numa lipase de maior atividade e estabilidade. Todos esses resultados sugerem que a região C-terminal é muito importante para atividade de lipases microbianas.

5.4.1 Superexpressão, Purificação e Caracterização de Lip-LifC6G9

A co-expressão Lip-LifC6G9, (3.6 na TABELA 11) foi superexpressa e purificada para sua caracterização cinética e bioquímica. A lipase, que possui cauda His, liga-se à coluna de afinidade e é então eluída complexada com sua foldase (sem cauda His) com a concentração de imidazol entre 0,208 mol L⁻¹ e 0,280 mol L⁻¹, o que pôde ser observado conclusivamente no eletroforegrama SDS-PAGE (FIGURA 32 A). As duas bandas principais presentes em todas as linhas do gel correspondem à lipase LipC6G9 (32.029,9 Da) e à foldase LifC6G9

⁵ Quimera molécula de DNA recombinante formada por fragmentos de DNA de mais de um organismo.

(23.882,5 Da), segundo os parâmetros teóricos obtido pelo programa ProtParam (GASTEIGER *et al.* 2005). A análise por densitometria do gel SDS-PAGE (FIGURA 32 B), usando LabWorks Image Acquisition and Analysis Software 4.0 (UVP Bioluminescence Systems, Upland, CA, USA), das frações eluídas da coluna de níquel identificou 95% de pureza do complexo Lip-LifC6G9. Essa análise também revelou que o complexo é formado por 50% da lipase e 50% da foldase.

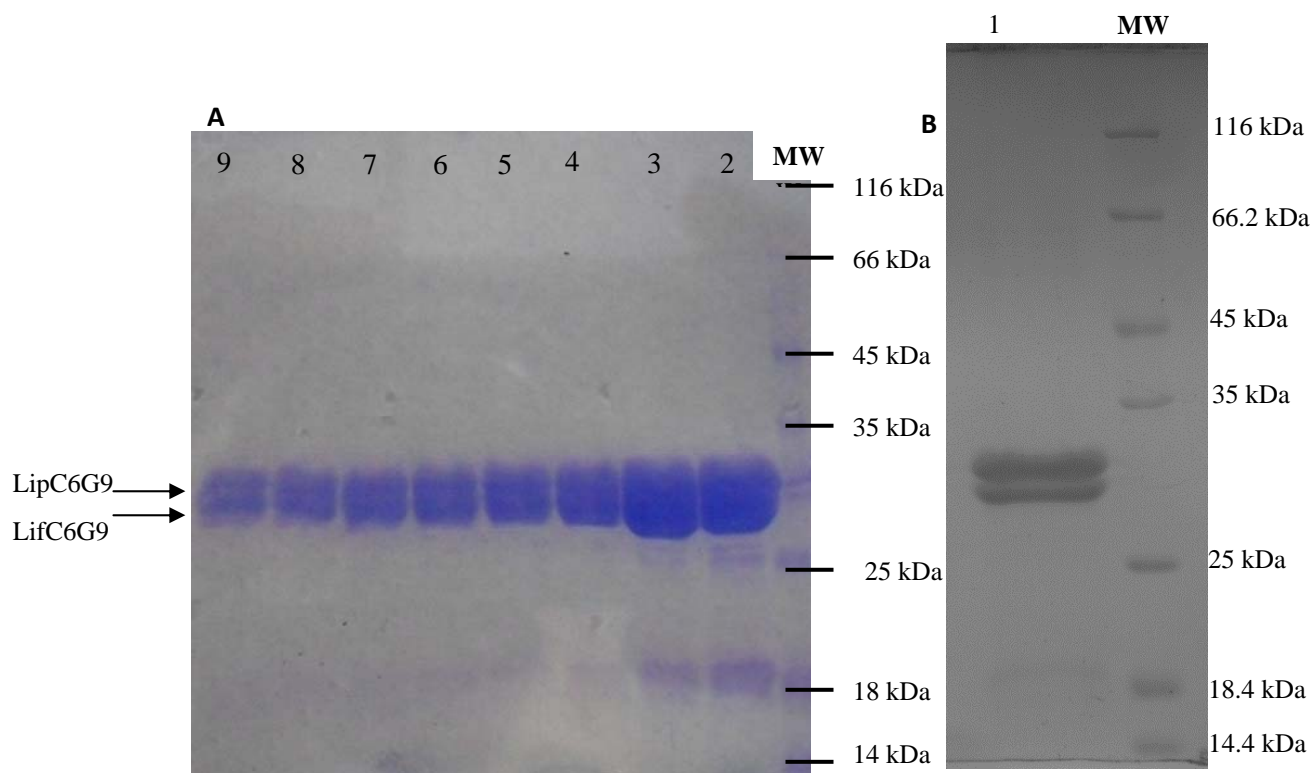


FIGURA 32– ELETROFOREGRAMAS SDS-PAGE APÓS PURIFICAÇÃO DA LIPASE LipC6G9 COMPLEXADA À SUA FOLDASE (LIFC6G9)

Em (A), frações eluídas da coluna de níquel (Ni^{2+}) (HisTrap™), linhas 2-9 correspondem ao complexo protéico Lip-LifC6G9 eluído com a concentração de imidazol entre $0,208 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,280 \text{ mol L}^{-1}$. Em (B), após diálise, linha 1 corresponde às frações coletadas (2-9 de A) unidas após diálise. MW ou Marcadores de massa molecular: 116kDa, β -galactosidase, 66kDa, albumina soro bovina, 45kDa, ovoalbumina, 35kDa, lactato desidrogenase, 25kDa, REase Bsp98, 18kDa, β -lactoglobulina, 14kDa, lisozima. O volume de amostra aplicada em cada poço foi de $10 \mu\text{L}$ ou $0,025 \text{ mg}$ de proteínas.

O fato de LifC6G9 permanecer complexada à LipC6G9 após a purificação foi um resultado interessante, embora o propósito fosse apenas obter a lipase ativa e não necessariamente complexada. Um trabalho desenvolvido por PAUWELS *et al.* (2006, 2005,) tiveram como objetivo obter lipase e a foldase de *B. glumae* complexadas para determinar sua estrutura, utilizando uma estratégia diferente da deste trabalho. PAUWELS *et al.* (2005) expressaram separadamente ambas as

proteínas e então as associaram na etapa de purificação, enquanto LipC6G9 foi expressa e purificada em uma única etapa. Os autores descrevem que a foldase de *B. glumae* foi expressa em vetor com cauda His e em organismo heterólogo, já a sua lipase foi expressa sem cauda His e em um hospedeiro homólogo, a fim de garantir a conformação nativa da enzima. Para a purificação por cromatografia de afinidade, foi primeiramente adicionado o extrato contendo a foldase, posteriormente foi adicionado o extrato com a lipase e, então, ambas as proteínas foram eluídas, resultando na obtenção do complexo. No presente trabalho, o extrato contendo LipC6G9 com cauda His co-expressa com LifC6G9 em diferentes plasmídeos foi purificado e o complexo Lip-LifC6G9 foi obtido.

5.4.2 Zimograma do Complexo Lip-LifC6G9

Após a purificação, foi feito o zimograma de Lip-LifC6G9 utilizando o substrato tricaprilina. A FIGURA 33 mostra o eletroforegrama SDS-PAGE (com tampão da amostra não redutora, isto é, sem β -mercaptoetanol) corado com Comassie blue (FIGURA 33 A) e não corado (FIGURA 33 B). Este último foi colocado sobre uma placa de Petri contendo o meio com substrato tricaprilina, e incubado por 24 h, a 37 °C, revelando duas bandas com atividade lipolítica, observadas pelo halo formado sobre o gel, resultante da atividade da enzima difundida na camada contendo o substrato. As duas bandas com atividade, uma na região de 60 kDa e outra em 30 kDa, são provavelmente correspondentes à lipase complexada à sua foldase e à lipase isolada, respectivamente. O halo formado na região de 30 kDa mostra que a lipase, após enovelamento, mas dissociada de sua foldase, apresenta atividade.

As duas proteínas LipC6G9 e LifC6G9 foram excisadas do gel de poliacrilamida SDS-PAGE e confirmadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Análises das seqüência dos peptídeos confirmam a identidade. As massas encontradas dos espectros obtidos pelo MALDI-TOF foram comparadas com as massas previstas pela clivagem peptídica *in silico* pelo programa ProteinProspector v.5.7.2 (CHALKLEY *et al.* 2005) e identificaram 25% e 39% dos fragmentos, respectivamente. Análises das seqüências pelo MALDI-TOF, juntamente com

zimograma e seqüenciamento dos nucleotídeos identificaram o complexo purificado.

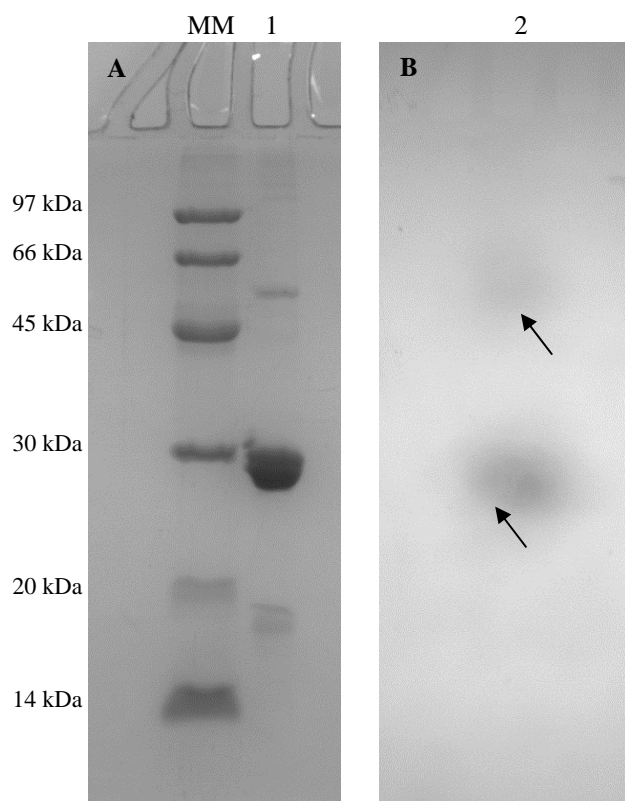


FIGURA 33 - ZIMOGRAMA DO COMPLEXO Lip-LipC6G9 PURIFICADO

(A): Eletroforegrama SDS -PAGE com tampão da amostra não desnaturante, corado com Comassie blue. (B): Zimograma de atividade. Substrato: tricaprilina. MW: Marcadores de massa molecular: 97 kDa, fosforilase; 66 kDa, albumina; 45 kDa, ovoalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20 kDa, inibidor de tripsina; e 14 kDa, lactoalbumina. Volume aplicado: 10 µL de solução da proteína (0,025 mg).

5.4.3 Análise Filogenética e Estimativa da Estrutura Secundária da Lipase LipC6G9

Vários novos genes que codificam lipases têm sido identificados a partir de bibliotecas metagenômicas. As novas lipases podem ser categorizadas em membros das famílias de lipases bacterianas, segundo a classificação proposta por ARPIGNY e JAEGER (1999) e ainda formar membros de uma nova família de lipases como descrito por LEE *et al.* (2006). Análise filogenética para a nova lipase LipC6G9 (FIGURA 34), identificou-a como pertencente à família I.1, na qual estão inclusas as lipases de *P. aeruginosa* [GenBank: ACA49549.1], *A. hydrophila* [GenBank: ABK37008.1] e *A. veronii* [GenBank: AEB48282.1], sendo que este

último é o microrganismo cuja lipase e foldase são de maior identidade com LipC6G9 e LifC6G9, como anteriormente descrito (item 5.2.2).

Lipases pertencentes às subfamílias I.1 e I.2, para apresentarem-se ativas, freqüentemente dependem de uma chaperona, denominada de Lif, isto é, foldase específica à lipase (ARPIGNY e JAEGER, 1999; JAEGER, DIJKSTRA, REETZ, 1999; QUYEN *et al.* 1999). É exatamente esse o caso de LipC6G9, que depende de LifC6G9. Esses resultados reforçam que LipC6G9 segue provavelmente o mecanismo Sec de secreção para algumas lipases de *Aeromonas sp* (PEMBERTON *et al.* 1997). É importante destacar que a análise filogenética evidencia que LipC6G9 se alinha com os microrganismos de gênero *Aeromonas* e *Pseudomonas* pertencentes à família I.1, embora esses mesmos gêneros e mesmas espécies de outras estirpes também estejam agrupados em outras famílias, como por exemplo, *A. hydrophila* [GenBank:ABK35818.1] e *P. aeruginosa* [GenBank: CAC14200.1], que pertencem à família II (família GDSSL).

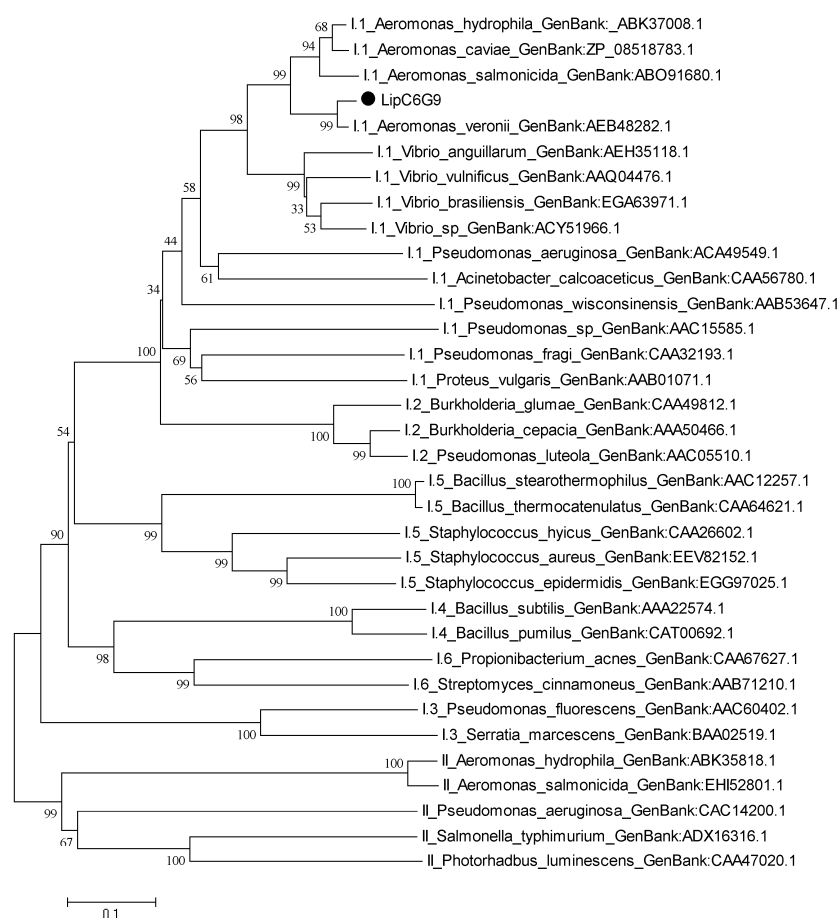


FIGURA 34 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA LIPASE

LipC6G9 apresenta maior similaridade com as lipases de *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.* LipC6G9 é um membro da subfamília I.1 (ARPIGNY e JAEGER, 1999), com homologia próxima a lipase de *Aeromonas sp.* A árvore filogenética foi gerada usando o programa Mega 5.

Para estimar a estrutura secundária de LipC6G9, foi realizado um estudo comparativo com outras lipases que tinham a estrutura tridimensional conhecida. Foram selecionadas as seguintes lipases do PDB, com as respectivas similaridades com LipC6G9 citadas entre parênteses: 1EX9.pdb de *P. aeruginosa* (72%), 1YSL.pdb de *B. cepacia* (54%), 1OIL.pdb de *Pseudomonas sp* (53%), 2ES4.pdb de *B. glumae* (51%) e 1TAH.pdb de *B. glumae* (51%), (previamente denominada de *Chromobacterium viscosum*).

A FIGURA 35 mostra o alinhamento correspondente e a estimativa da estrutura secundária de LipC6G9 comparada às demais estruturas de lipases. Para mostrar esse alinhamento, foi utilizado o programa computacional ALINE (BOND e SCHÜTTELKOPF, 2009). As estruturas secundárias foram estimadas pelo programa *dssp* (KABSCH e SANDER, 1983). O fundo está colorido de acordo com a convenção de *Alscript calcons* (BARTON, 1993). Acima das seqüências, são apresentadas as estruturas secundárias das proteínas do PDB, setas para fitas- β e cilindros para α -hélices.

A região N-terminal de LipC6G9 não se alinha às demais estruturas do PDB, que representa possivelmente o peptídeo sinal *in vivo* para LipC6G9 que é perdido. Foi possível verificar pelo alinhamento que LipC6G9 apresenta o pentapeptídeo catalítico convencional Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly das lipases pertencentes à família I.1 (ARPIGNY e JAEGER, 1999), onde a Ser⁹⁹ é um dos resíduos catalíticos e Xaa dois resíduos His. Os outros dois resíduos catalíticos são Asp²⁴⁶ e His²⁶⁸, estão posicionados na região C-terminal da lipase, região esta onde se localiza o dobramento α/β hidrolase, típico de lipases. O dobramento α/β hidrolase é o responsável pela manutenção da justaposição dos resíduos do pentapeptídeo do sítio ativo (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly), análogos ao de serinas proteases (WONG, SCHOTZ, 2002; BRENNER, 1988).

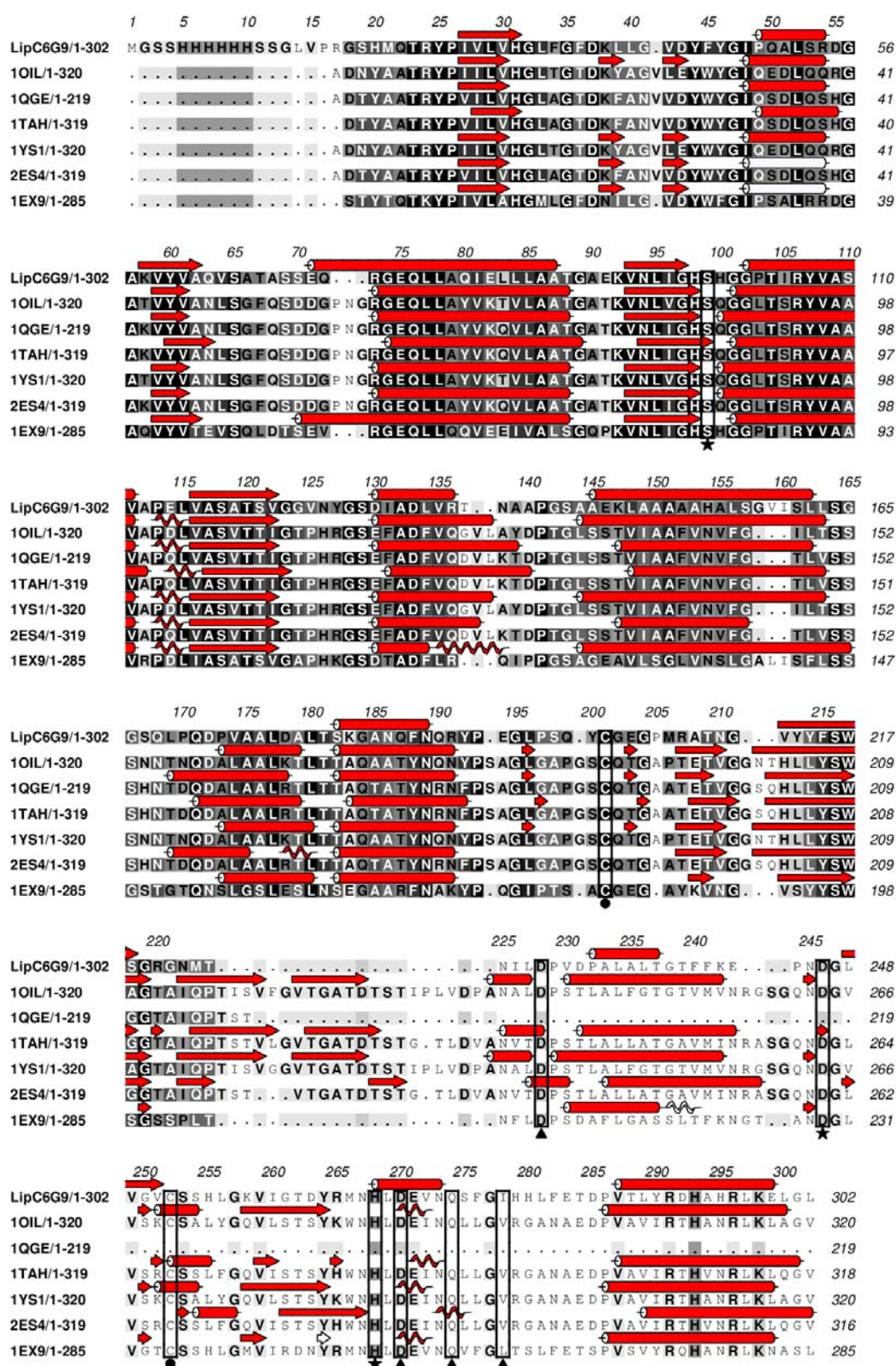


FIGURA 35 – ALINHAMENTO DA LIPASE LipC6G9 COM ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE LIPASES DO *PROTEIN DATA BANK* (PDB)

As estrelas indicam os resíduos que compõem a tríade catalítica, os triângulos indicam a possível ligação do íon Ca^{2+} , e os círculos indicam os dois resíduos cisteínas que formam a ligação dissulfeto. Figura apresentada com o programa Aline (BOND e SCHÜTTELKOPF, 2009).

O alinhamento de LipC6G9 com outras estruturas de lipases bacterianas mostram um possível sítio de ligação do íon cálcio na região C-terminal. Os resíduos preditos por estarem envolvidos na ligação do íon cálcio são Asp²²⁸, Asp²⁷⁰, Gln²⁷⁴, Ile²⁷⁸; os três últimos Asp²⁷⁰, Gln²⁷⁴, Ile²⁷⁸ também estão posicionados na região C-terminal. Um grande número de enzimas requer a presença de íons metálicos, tais como íon cálcio, para a manutenção de suas estruturas estáveis e ativas. Estes íons estão ligados a sítios específicos de ligação na superfície das moléculas e restringem a flexibilidade local ou desdobramento (SHARMA *et al.* 2002). Evidências do aumento da termoestabilidade e atividade de lipase bacterianas em presença do íon cálcio têm sido relatadas (VELU, NANDHINIDEVI, GAUTAM, 2012; GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011; KIM *et al.* 2002; AMANDA *et al.* 2001; LOTRAKUL, SAVANEE e DHARMSTHITI, 1997; MATSUMAE e SHIBATANI, 1994), inclusive para enzimas lipolíticas derivadas de metagenômica (GLOGAUER *et al.* 2012; MEILLEUR *et al.* 2009; ELEND *et al.* 2007).

LipC6G9 contém dois resíduos de cisteína que são preditos como formadores de uma ligação dissulfeto (Cys²⁰¹-Cys²⁵²), assim como em outras lipases de *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* (BRUMLIK *et al.* 1997). A ligação dissulfeto é mais um indicativo de que LipC6G9 deve ser uma lipase extracelular no seu organismo original, provavelmente *Aeromonas sp.*, sendo importante para integridade estrutural da molécula, mas não é requerida para secreção da enzima (BRUMLIK *et al.* 1997). Lip-LifC6G9 é uma nova lipase de metagenômica com similaridade com a lipase de *Aeromonas veronii* nunca antes caracterizada.

5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE

Os ensaios de purificação mostraram que lipase LipC6G9 é eluída da coluna de níquel complexada à sua foldase. Por isso, todos os ensaios de caracterização da enzima livre foram feitos com o complexo purificado, **Lip-LifC6G9**.

5.5.1 Atividade da Lipase Lip-LifC6G9 para Diferentes Substratos

A atividade específica da enzima purificada foi determinada para os substratos naturais e óleos comerciais (TABELA 12), sendo observado o decréscimo da atividade com o aumento da cadeia carbônica do ácido graxo (de 1851,9 a 817,3 U mg⁻¹) para os substratos naturais.

TABELA 12 - ATIVIDADES DA LIPASE Lip-LifC6G9 COMPARADA ÀS DA LIPASE LipC12 PARA DIFERENTES SUBSTRATOS

Substratos	Atividade Específica Lip-LifC6G9 (U mg ⁻¹)	Atividade Específica LipC12 (U mg ⁻¹) **
Trioleína		
C18:1	817,3± 69,7	1000
Tricaprilina		
C8	1566,1± 100,6	1200
Tributirina		
C4	1851,9± 80,4	2000
Girassol		
C18:1 (15-35%)*	903,6± 17,0	1300
C18:2 (55-75%)*		
Canola		
C18:1 (53-70%)*	1030,1± 42,6	1300
C18:2 (15-30%)*		
Soja		
C18:1 (19-30%)*	1048,2± 51,1	1100
C18:2 (44-62%)*		
Oliva		
C18:1 (83-64%)*	1192,8± 102,2	1700
C18:2 (5,0-14%)*		
Milho		
C18:1 (24-42%)*	1066,3± 42,6	1200
C18:2 (34-62%)*		
Palma		
C18:1 (36-47%)*	1042,2± 59,6	700
C18:2 (6,5-15%)*		
Mamona		
C18:1 (2,9-0,6%)*	204,8± 17,0	250
C18:2 (0,5-0,5%)*		
Côco		
C18:1 (12-19%)*	945,8± 25,6	1100
C18:2 (1,0-3,5%)*		
Óleo de soja de fritura	873,5± 42,6	-

*Porcentagens de ácido graxos derivados do ácido oleico e linoleico.

Fonte: <http://www.campestre.com.br/>

** Valores aproximados de atividade obtidos por GLOGAUER (2011).

O fato de a atividade da lipase diminuir com o aumento da cadeia do triglicerídeo pode ser atribuído não somente à especificidade da enzima, mas também à qualidade da emulsão usada para a dosagem da atividade, pois substratos de cadeia carbônica do ácido graxo menor são mais solúveis e podem formar emulsões com maior área interfacial, como relatado anteriormente por

GLOGAUER (2011). A atividade para a trioleína confirma que Lip-LifC6G9 é uma lipase verdadeira (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER *et al.* 1994).

Comparando-se a atividade de Lip-LifC6G9 com as atividades de outras lipases de metagenômica (TABELA 4, Pag. 18) foi possível verificar que Lip-LifC6G9 apresentou maior atividade específica ($817,3 \text{ U mg}^{-1}$) para o substrato trioleína (C18: 1), superior a das lipases de metagenômica RlipE1 e RlipE2 (346 e 232 U mg^{-1} , respectivamente) isoladas de uma biblioteca metagenômica do rúmem de boi (LIU *et al.* 2009).

A TABELA 12 mostra a comparação das atividades específicas para vários substratos de Lip-LifC6G9 e de LipC12, isolada da mesma biblioteca metagenômica (GLOGAUER *et al.* 2011). Observou-se que, embora LipC12 apresente na maioria dos casos uma maior atividade que Lip-LifC6G9, os perfis de atividade são semelhantes, embora para Lip-LifC6G9 a atividade em tricaprilina é duas vezes maior do que a atividade em trioleína, enquanto LipC12 apresenta um aumento de 20% para os mesmos substratos. Assim como LipC12, Lip-LifC6G9 também apresenta atividades comparáveis às das lipases comerciais de *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola lanuginosa*), que apresentam atividades para óleo de oliva de 1000, 3300 e 2900 U mg^{-1} , respectivamente (NINI *et al.* 2001).

Muitos procedimentos para redobramento de lipases têm sido descritos na literatura a fim de aumentar o rendimento na obtenção de lipases ativas; entre eles estão o redobramento *in vitro* e o redobramento *in vivo*, denominado também de co-expressão, que foi a estratégia utilizada no presente trabalho. O redobramento *in vitro* utiliza a adição da foldase à lipase em solução, após esta ter sido expressa. O redobramento *in vivo* ou co-expressão de LipC6G9 com LifC6G9 resultou na enzima com elevada atividade (cerca de 820 U mg^{-1} para trioleína) para enzima purificada comparada ao trabalho de MADAN e MISHRA (2010), que utilizaram a mesma estratégia para lipase de *P. aeruginosa* B2264, e relataram baixa atividade (cerca de 225 U mg^{-1}) utilizando como substrato o palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP, TABELA 13).

TABELA 13 – ESTRATÉGIA DE REDOBRAMENTO DE LIPASES UTILIZADA EM ALGUNS TRABALHOS

Lipases	Atividade da Lipase Antes da estratégia	Estratégia (Lipase+ Foldase)	Atividade Após estratégia	Atividade da lipase purificada (substrato)	Referência
<i>Pseudomonas</i> KWI 56	0	<i>in vitro</i>	310 U mg ⁻¹	3900 U mg ⁻¹ (Trioleína)	TRAUB <i>et al.</i> (2001)
<i>C. viscosum</i>	0	<i>in vitro</i>	190 U mg ⁻¹	2800 U mg ⁻¹ (Trioleína)	TRAUB <i>et al.</i> (2001)
<i>B. cepacia</i> ATCC21808	60% corpos de inclusão	<i>in vitro</i>	314 U mg ⁻¹	-	QUYEN <i>et al.</i> (1999)
PAL B2264	14 U mg ⁻¹ (pNPP)	<i>in vivo</i>	-	225 U mg ⁻¹ (pNPP)	MADAN e MISHRA (2010)
Lip-LifC6G9 Metagenômica	0	<i>in vivo</i>	-	820 U mg ⁻¹ (Trioleína)	Este trabalho

Alguns trabalhos reportam o redobramento *in vitro* da lipase, como o trabalho de HOBSON e colaboradores (1993), para a lipase de *Pseudomonas* expressa em *E. coli*, que após o procedimento obtiveram um rendimento de apenas cerca de 5 a 10% de atividade da lipase comparada à atividade inicial (anterior ao redobramento *in vitro*). TRAUB *et al.* (2001) relataram o redobramento *in vitro* utilizando o protocolo de QUYEN *et al.* (1999), para as lipases de *Pseudomonas* sp KWI 56 e *C. viscosum* e compararam os seus resultados aos obtidos por QUYEN *et al.* (1999) para a lipase de *B. cepacia* ATCC21808. As lipases expressas e desnaturadas foram redobradas com a foldase com a extremidade N-terminal truncada e apresentaram em atividades específicas, para células úmidas de *E. coli*, de 310 U mg⁻¹ e 190 U mg⁻¹, comparadas a 314 U mg⁻¹ para a lipase de *B. cepacia* ATCC21808 de atividade para trioleína. Após esse procedimento as lipases de *Pseudomonas* sp KWI 56 e *C. viscosum* foram purificadas e apresentaram atividade específicas de 3900 U mg⁻¹ e 2800 U mg⁻¹, respectivamente. Essas atividades são comparáveis à atividade específica de Lip-LifC6G9 (820 U mg⁻¹), o que significa que a técnica de co-expressão utilizada no presente trabalho foi tão eficiente quanto o redobramento *in vitro* e com a vantagem de se utilizar um procedimento de uma única etapa.

5.5.2 Efeito da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9

A FIGURA 36 mostra o efeito da temperatura na atividade e na estabilidade de Lip-LifC6G9. Observa-se a máxima atividade (1500 U mg^{-1}) em 30°C , mas com uma alta atividade ainda a 40°C (ca. 1300 U mg^{-1} , 86%). Quando foi determinada a atividade residual por incubação prévia em diferentes temperaturas por 1,5 h, observou-se que Lip-LifC6G9 é estável entre 10 a 40°C e que mantém aproximadamente 70% da atividade inicial a 50°C e 50% a 60°C .

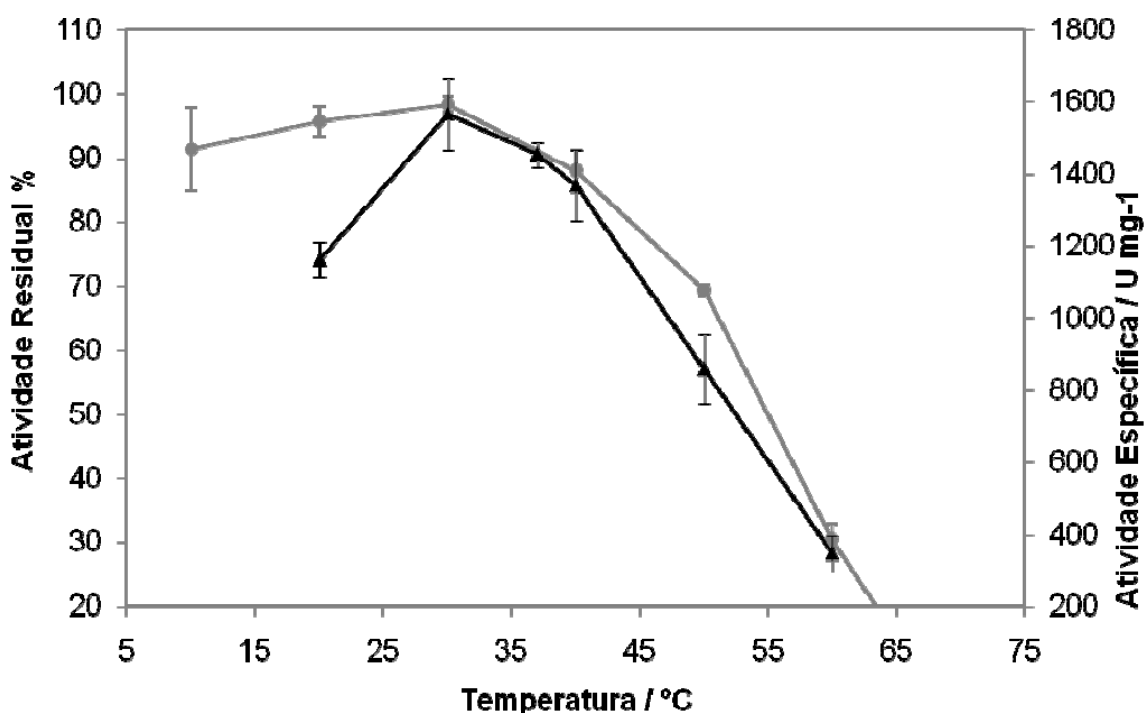


FIGURA 36 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9

A atividade específica nas diferentes temperaturas está apresentada em cor preto e a estabilidade em cinza.

Determinação da atividade: substrato tricaprilina; pH 7,5, a 30°C . Para os ensaios de estabilidade, a enzima foi incubada por 1,5 h antes da determinação da atividade residual, 100% é igual à atividade a 30°C depois de 1,5 h de incubação.

Lip-LifC6G9 apresentou uma atividade máxima a 30°C , que é mesma temperatura que a de LipC12, oriunda da mesma biblioteca metagenômica (GLOGAUER *et al.* 2011). Lipases bacterianas têm sido reportadas como tendo uma temperatura ótima para a atividade entre 30 a 60°C (GUPTA *et al.* 2004). Lip-LifC6G9 apresentou termoestabilidade comparável às das lipases de *Aeromonas caviae* AU04 (VELU, NANDHINIDEVI, GAUTAM, 2012) e *A. sobria* LP004 (LOTRAKUL, SAVANEE e DHARMSTHITI, 1997), que mantiveram 100% sua atividade quando incubadas por 1,5 h em temperaturas de até 40°C , e apresentou termoestabilidade ligeiramente menor que as lipases de *Aeromonas* sp. LPB 4 (LEE *et al.* 2003) e *A. hydrophila* marinha (NEELAMBARI *et al.* 2011),

que mantiveram 100% da atividade quando incubadas em temperaturas de até 50 °C.

5.5.3 Efeito do pH na Atividade e na Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9

Lip-LifC6G9 apresenta atividade máxima de aproximadamente 1500 U mg⁻¹ em uma ampla faixa de pH (de 6,5 a 10,5) (FIGURA 37). Para ensaios de estabilidade, a enzima foi incubada em diferentes tampões por 1,5 h e sua atividade residual medida pelo ensaio padrão para tricaprilina, a pH 7,5 e 30 °C, e se manteve estável na faixa de pH entre 5,5 a 9,5. Foi observada a preferência de Lip-LifC6G9 pelo tampão MES, apresentando uma atividade residual de 100% mesmo em pH 5,5, enquanto que em tampão citrato no mesmo pH, a atividade foi a metade (aproximadamente 700 U mg⁻¹).

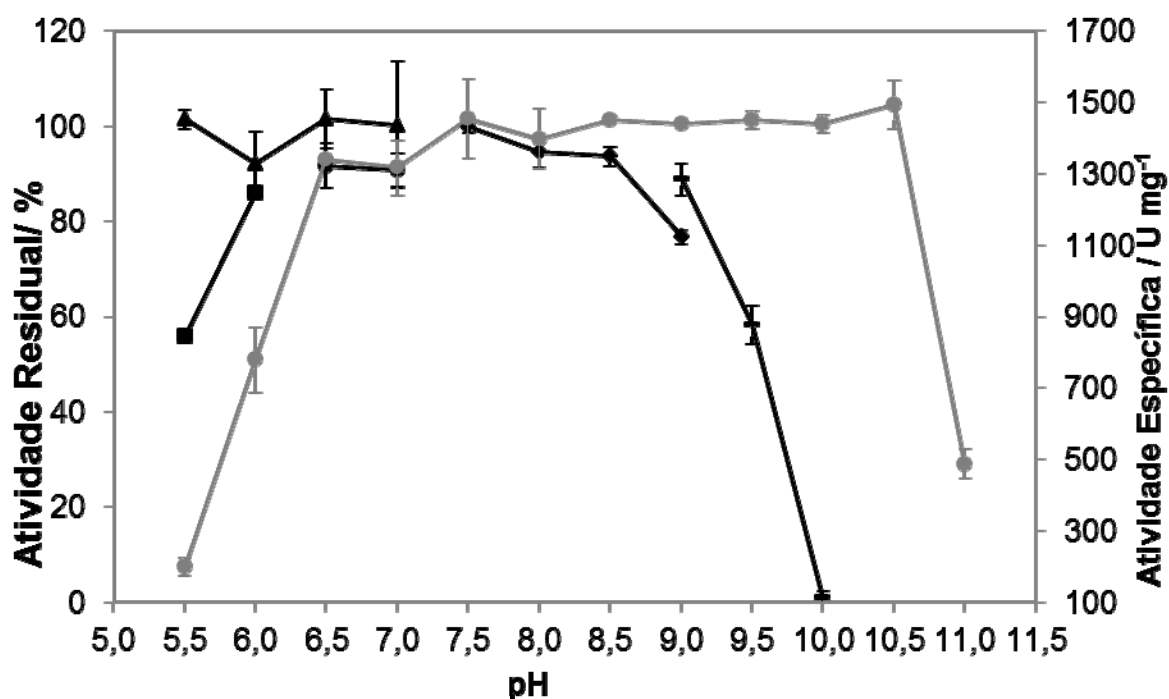


FIGURA 37 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9. Em linha cinza é apresentada a atividade específica da enzima e em preto a estabilidade ao pH. Determinação de atividade: substrato, tricaprilina pH 7,5, a 30 °C.; para os ensaios de estabilidade, a enzima foi incubada por 1,5 h a 30 °C antes da determinação da atividade. Foram usados os tampões citrato (■), MES (▲), citrato-fosfato (●), Tris-HCl (♦), glicina (—) na concentração 50 mmol L⁻¹.

Lip-LifC6G9 apresentou atividade máxima na mesma faixa de pH (entre 7,0 a 10,0) da apresentada pela lipase marinha de *A. hydrophila* (NEELAMBARI *et al.* 2011) e estabilidade comparável (mantendo sua atividade em quase 100% entre

pH 6 a 10) à da lipase, recentemente isolada, de *A. caviae* AU04 (VELU, NANDHINIDEVI, GAUTAM, 2012), que foi incubada nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho (1,5 h a 30 °C), entretanto o método utilizado para determinação de atividade foi o método pNPP.

Em relação às características de pH, Lip-LifC6G9 apresentou elevada atividade e estabilidade em valores de pH alcalinos. A atividade em pH alcalinos é comum para lipases bacterianas (GUPTA *et al.* 2004), que exibem atividade em valores de pH acima de 8, entretanto, Lip-LifC6G9 também apresentou-se estável em pH alcalinos e um pouco mais baixos, entre 6,0 a 8,0. Além disso, Lip-LifC6G9 apresentou-se estável em uma ampla faixa de pH que é uma característica mais rara para lipases.

5.5.4 Estabilidade da Lipase Lip-LifC6G9 em Solventes Orgânicos Hidrofílicos

Na TABELA 14 são apresentados os resultados de estabilidade de Lip-LifC6G9 em diferentes concentrações de solventes orgânicos hidrofílicos. De maneira geral, observou-se que a atividade de Lip-LifC6G9 decresceu com o aumento da concentração dos solventes, com exceção do DMSO, onde a lipase manteve alta atividade (acima de 85%) para todas as concentrações estudadas.

TABELA 14 - ESTABILIDADE DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS HIDROFÍLICOS

% de Solvente	Solventes	Log P**	Atividade* Residual (%)	Solventes	Log P**	Atividade* Residual (%)
30	Acetona	-0,23	85,3 ± 0	DMSO	-1,30	89,1 ± 0
50			77,5 ± 0			89,1 ± 0
75			69,8 ± 0			85,3 ± 5
30	Etanol	-0,24	81,4 ± 0	Acetonitrila	-0,33	77,5 ± 0
50			65,9 ± 5			77,5 ± 0
75			54,3 ± 5			Inativa
30	Isopropanol	0,28	77,5 ± 5	THF	0,49	77,5 ± 5
50			62,0 ± 0			31,0 ± 0
75			65,9 ± 10			34,9 ± 0

*As medidas de atividade foram realizadas pelo método titulométrico, com tricaprilina, em pH 7,5 a temperatura de 30 °C. O tempo de incubação nos diferentes solventes foi de 1,5 h.

**Log P é logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água.

A estabilidade de lipases em DMSO, também foi estudada por outros autores para diferentes lipases (TABELA 14). Entretanto, os resultados são difíceis de comparar, pois as condições de incubação foram diferentes, como por exemplo: YOO *et al.* (2011), para lipase de *Rastonia*, relataram 82% de atividade depois da incubação por 24 h em 25% DMSO, a 28 °C; ZHAO *et al.* (2008) relataram 108% depois de 24 h em 10% DMSO a 30 °C para a lipase de *Serratia marcescens*; para a lipase de *P. aeruginosa* LST-03 OGINO *et al.* (2000) relataram 99% depois de 60 min em 50% DMSO a 30 °C e GAUR, GUPTA, KHARE, (2008) para a lipase de *P. aeruginosa* PseA relataram 100% depois de 24 h em 50% DMSO a 30 °C.

Embora Lip-LifC6G9 tenha sido inativa em acetonitrila 75% (V/V), a enzima teve atividade nas demais proporções de solvente 30% e 50% (V/V). Esses resultados são interessantes quando comparados a lipase de *Bacillus sphaericus* 205y que se apresentou completamente inativa em acetonitrila 50% (V/V) (HUN *et al.* 2003). Além disso, essa mesma enzima perdeu 80% da atividade em DMSO 50% (V/V).

A lipase de *Aeromonas caviae* AU04, (DIVAKAR, NANDHINIDEVI, GAUTAM, 2012) TABELA 15, apresenta atividades de 26% para etanol, 33% para isopropanol e 46% para acetonitrila quando incubada nestes a 25% (V/V), a 30 °C. A lipase de *Aeromonas sp.* LPB 4 (LEE *et al.* 2003) apresenta atividades 86% para etanol e 67% para isopropanol, quando incubada nestes a 50% (V/V) durante 1 h. Esses resultados indicam que Lip-LifC6G9 apresenta uma maior estabilidade em etanol, isopropanol, acetonitrila e acetona quando incubada por 1,5 h a 30 °C, quando comparada com as lipases de *Aeromonas caviae* AU04 (DIVAKAR, NANDHINIDEVI, GAUTAM, 2012) e estabilidade comparável a lipase de *Aeromonas sp.* LPB 4 (LEE *et al.* 2003) para os respectivos solventes.

A estabilidade de Lip-LifC6G9 em solventes apolares não foi avaliada, pois um sistema bifásico pode ser formado, uma vez que a enzima está solubilizada em tampão, impedindo o contato direto da enzima com o solvente e gerando um falso resultado de estabilidade (MÜLLER-SANTOS, 2009).

TABELA 15 – ESTABILIDADE DE ALGUMAS LIPASES FRENTE A SOLVENTES POLARES A 30 °C

Solventes	Lipases	Período de Incubação (h)	Proporção de solvente % (V/V)	Atividade Residual (%)	Referência
DMSO	<i>Rastonia</i>	24	25	82	YOO <i>et al.</i> (2011)
	<i>S. marcescens</i>	24	10	108	ZHAO <i>et al.</i> (2008)
	PAL LST-03	1	50	99	OGINO <i>et al.</i> (2000)
	PAL PseA	24	50	100	GAUR, GUPTA, KHARE, (2008)
	<i>B. sphaericus</i> 205y	9	50	20	HUN <i>et al.</i> (2003)
	PAL CS2	9	50	60	PENG <i>et al.</i> (2011)
	<i>B. sphaericus</i> 205y	9	50	Inativa	HUN <i>et al.</i> (2003)
Aceto-nitrila	<i>A. caviae</i> AU04	1	25	46	DIVAKAR, NANDHINIDEVI, GAUTAM (2012)
	<i>Rastonia</i>	24	25	24	YOO <i>et al.</i> (2011)
	<i>A. caviae</i> AU04	1	25	26	DIVAKAR, NANDHINIDEVI, GAUTAM (2012)
	<i>Rastonia</i>	24	25	47	YOO <i>et al.</i> (2011)
Etanol	<i>Aeromonas sp.</i> LPB 4	1	50	86	LEE <i>et al.</i> (2003)
	PAL CS2	9	50	85	PENG <i>et al.</i> (2011)
	<i>A. caviae</i> AU04	1	25	33	DIVAKAR, NANDHINIDEVI, GAUTAM (2012)
	<i>Rastonia</i>	24	25	20	YOO <i>et al.</i> (2011)
Iso propanol	<i>Aeromonas sp.</i> LPB 4	1	50	67	LEE <i>et al.</i> (2003)
	<i>Rastonia</i>	24	25	60	YOO <i>et al.</i> (2011)
Acetona	PAL CS2	9	50	65	PENG <i>et al.</i> (2011)

PAL: lipase de *Pseudomonas cepacia*

O fato de Lip-LifC6G9 apresentar-se estável em diferentes concentrações em alguns solventes orgânicos hidrofílicos torna-a interessante para aplicações biocatalíticas, visto que esses solventes são utilizados em inúmeras reações de síntese orgânica. A estabilidade da enzima frente a esses solventes, como por exemplo, etanol, favorece sua utilização na síntese de ésteres e reações de transesterificação.

Solventes polares miscíveis a água são mais desestabilizadores da estrutura protéica do que solventes apolares, imiscíveis a água, uma vez que removem a água de solvatação da enzima, levando à perda da estrutura tridimensional cataliticamente ativa da enzima (ZAKS e KLIBANOV, 1988). A estabilidade de lipases bacterianas ou fúngicas em solventes orgânicos hidrofílicos é uma característica rara (OGINO *et al.* 2001), pois muitas lipases são inativadas em

presença de álcool e poucas retêm a atividade total em solventes polares (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011), embora o efeito do solvente na atividade enzimática dependa fortemente do período de incubação (QUYEN *et al.* 2003; SCHMIDT-DANNERT *et al.* 1996). A estabilidade em vários solventes pode ser melhorada com a imobilização das enzimas (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

5.5.5 Imobilização da Lipase Lip-LifC6G9 em Accurel

5.5.5.1 Determinação da Quantidade de Proteína a ser Oferecida para a Imobilização

Com a finalidade de acompanhar todo o processo de imobilização foram realizadas medidas de atividade e de proteína no sobrenadante ao longo da imobilização, para o suporte Accurel MP-1000. Foram utilizadas concentrações iniciais de 1 a 4 mg de proteína por g de suporte, entretanto, essas concentrações não saturaram o Accurel MP-1000. Posteriormente, foram testadas concentrações maiores de proteínas 5, 10 e 15 mg de proteína por g de suporte. A FIGURA 38 mostra a cinética de imobilização entre os tempos de 0 a 48 h para as concentrações 5 -15 mg/g (proteína/suporte). As medidas de atividade para todas as concentrações testadas, durante a cinética de imobilização, foram determinadas em atividades residuais, sendo considerada 100% a atividade da enzima sem incubação.

Foi possível verificar através da cinética de imobilização (FIGURA 38) que na concentração 5, 10 e 15 mg/g (proteína/suporte) a diferença de atividade do sobrenadante entre os tempos de imobilização de 24 h e 36 h foi muito pequena; portanto o tempo de 24 h foi escolhido para imobilização da enzima.

A FIGURA 39 mostra a concentração de proteína residual, isto é, a proteína no sobrenadante que não foi adsorvida ao suporte durante o processo de imobilização para as concentrações estudadas de 0 a 48 h. A maior redução da concentração de proteína no sobrenadante após 48 h foi atingida quando se utilizou 5 mg/g.

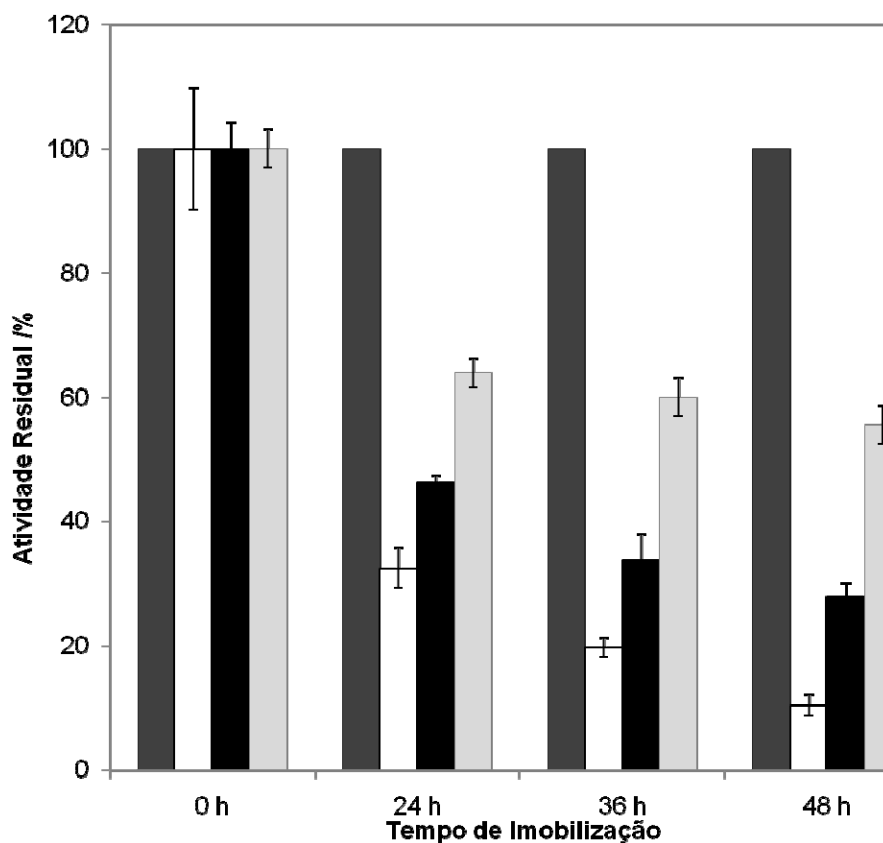


FIGURA 38 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE

Legenda: Barra em cor cinza escuro: 5 mg/g; Barra em cor branca: 10 mg/g; Barra em cor cinza claro: 15 mg/g. 100% as atividades no tempo 0 h.

Atividade determinada pelo método do titulométrico utilizando o substrato tricaprilina em pH 7,5 a temperatura de 30 °C.

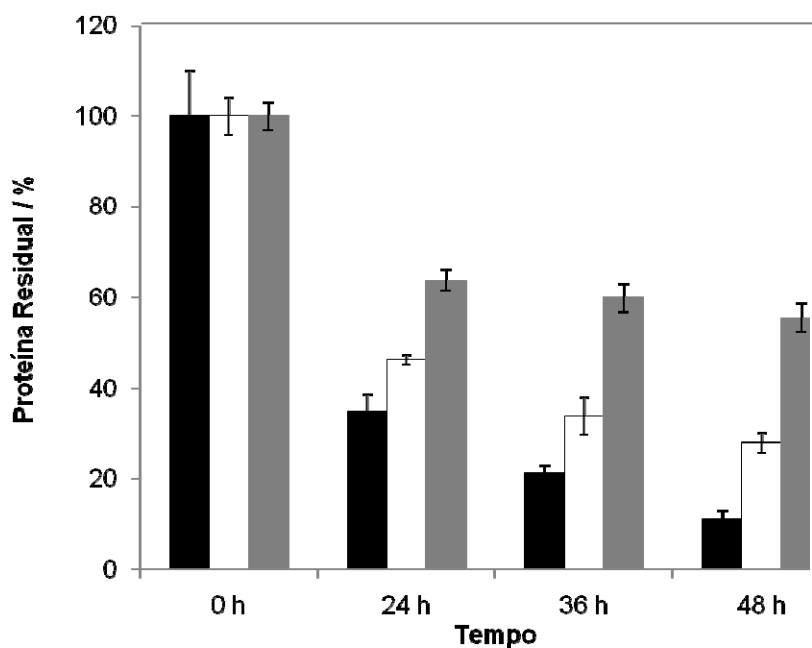


FIGURA 39 – PROTEÍNA RESIDUAL DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 EM ACCUREL MP-1000

Proteína residual determinada pelo método do Bradford (1976). Legenda: Barra em cor preta: 5 mg/g; Barra em cor branca: 10 mg/g; Barra em cor cinza: 15 mg/g.

5.5.5.2 Eficiência da Imobilização

Foi determinada a atividade de hidrólise de Lip-LifC6G9 imobilizada para a trioleína em meio aquoso e em solvente orgânico (*n*-heptano), e a partir dos resultados calcularam-se a eficiência de imobilização e a retenção de atividade de hidrólise para as concentrações de 5, 10 e 15 mg/g (proteína/suporte) após 24 h (TABELA 16).

TABELA 16 - EFICIÊNCIA E RETENÇÃO DE ATIVIDADE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Lip-LifC6G9 OFERECIDAS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Proteína/ Accurel MP-1000	Atividade de Hidrólise * (meio aquoso) (U g ⁻¹)	Atividade de Hidrólise ** (meio orgânico) (U g ⁻¹)	Eficiência * (E%)	Retenção (R%) *	Retenção (R%) **
5 mg/g	197,4 ± 9,4	219,3 ± 28,3	68	7,0	248
10 mg/g	198,8 ± 2,4	230,7 ± 6,1	54	4,5	164
15 mg/g	227,5 ± 3,1	249,8 ± 22,2	36	5,1	178

* Atividade de hidrólise em meio aquoso - método do titulométrico utilizando trioleína, em pH 7,5, 30 °C.

** Atividade de hidrólise em meio orgânico (*n*-heptano) determinada pelo método de Lowry-Tinsley com o substrato trioleína, 30 °C.

A TABELA 16 indica que uma menor concentração de proteína (5 mg) oferecida por g de suporte teve uma eficiência maior, (68%), comparada às outras concentrações de proteína testadas (10 e 15 mg/g) que apresentaram 54% e 36% de eficiência, respectivamente. Embora o resultado de eficiência seja um indicativo da imobilização da enzima, ele não garante que a enzima esteja ativa no suporte, pois este parâmetro mostra apenas que houve o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização. Então, testes de atividade de hidrólise para a enzima imobilizada (em meio aquoso e orgânico) com as concentrações 5, 10 e 15 mg/g foram realizados. As atividades de hidrólise tanto em meio orgânico quanto aquoso para as três concentrações de lipase imobilizada apresentaram valores muito próximos, em torno de 200 U g⁻¹.

Os resultados de retenção de atividade apresentados na TABELA 16 mostram que os valores em meio aquoso foram muito baixos comparativamente aos

valores em meio orgânico, que excederam 100%. Esses resultados indicam o fenômeno de ativação para as três concentrações de proteína oferecidas para imobilização (5, 10 e 15 mg/g), isto é, as atividades experimentais foram superiores às atividades calculadas e evidenciam a importância da imobilização da enzima para utilização em meios não convencionais de catálise, isto é, em meio orgânico.

O fenômeno de ativação também foi observado para lipases de *Mucor miehei* e *Candida rugosa* imobilizadas em Octadecil-sepabeads (PALOMO *et al.* 2002). A lipase de *M. miehei* sofreu uma ativação de vinte vezes quando imobilizada. A lipase de *C. rugosa* imobilizada neste suporte manteve sua atividade inalterada mesmo após 10 h a 45°C, enquanto a enzima livre foi totalmente inativada em 2 h nas mesmas condições. A lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada Accurel EP-100 apresentou uma retenção de atividade em meio orgânico de 193% (BARON, 2008). PALOMO *et al.* (2002) sugerem que essa ativação seja devida à estabilização da forma aberta da lipase quando esta é adsorvida pelo suporte hidrofóbico, o que também pode justificar a ativação encontrada no presente trabalho para o Accurel. BASTIDA *et al.* (1998) imobilizaram uma lipase de *H. lanuginosa* em octil-agarose e observaram uma ativação de vinte vezes. Os autores sugerem que este fenômeno ocorra devido à elevada hidrofobicidade desse suporte, ou seja, devido à existência de grandes áreas hidrofóbicas no octil-agarose, onde as lipases estariam simultaneamente se adsorvendo e sofrendo ativação interfacial.

Embora nas concentrações maiores de proteínas (10 e 15 mg/g) oferecidas à imobilização o fenômeno de ativação seja mais pronunciado, o que se observa pelos valores de retenção em meio aquoso, em meio orgânico ocorre uma diminuição considerável da eficiência. Além disso, a atividade para as três concentrações de enzima imobilizada são praticamente iguais (TABELA 16). A partir desses resultados pode-se supor que uma maior concentração de enzima oferecida ao processo de imobilização gere o fenômeno conhecido como “*overcrowding*”, isto é, as proteínas podem estar adsorvendo umas sobre as outras, impedindo a exposição do sítio ativo à catálise (ALMEIDA *et al.* 2008), diminuindo a eficiência catalítica, fazendo com que a atividade seja praticamente constante, mesmo em concentrações maiores de enzima oferecidas à imobilização.

Uma vez que os valores de atividade para as três concentrações (5, 10 e 15 mg/g) foram muito próximos tanto em meio orgânico quanto em meio aquoso, a concentração oferecida para imobilização de 5 mg/g e um tempo de contato de 24 h, foram escolhidos para a imobilização de Lip-LifC6G9, a ser utilizada nos de testes de estabilidade e de esterificação.

A eficiência de adsorção para uma esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em Accurel MP-1000 (83%), foi comparável à de Lip-LifC6G9, sendo fornecida uma quantidade 12,4 mg de proteína por g de suporte (KOLLING *et al.* 2011). Já as lipases de *Geobacillus thermoleovarans* (SÁNCHEZ-OTERO *et al.* 2010) imobilizada em Accurel EP-100 resultou em 8,7 mg/g de proteína adsorvida ao suporte, respectivamente. A esterase de *Pyrococcus furiosus* imobilizada em Accurel MP-1000 resultou em 35,5 mg/g de proteína oferecida à adsorção ao suporte (ALMEIDA *et al.* 2008). De acordo com ALMEIDA *et al.* (2008), há uma grande variação nos resultados de adsorção de enzima ao suporte, o que pode estar relacionado ao sistema de adsorção, às características da enzima, à área superficial, ao tamanho da partícula e do poro do suporte, que parecem desempenhar importante papel no processo de adsorção.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA

5.6.1 Atividade de Hidrólise em meio Aquoso e Orgânico para Trioleína

A TABELA 17 traz as atividades de hidrólise de Lip-LifC6G9 imobilizada para o substrato trioleína em meios aquoso e orgânico. Esta preparação imobilizada foi utilizada em todos os experimentos posteriores. As atividades de hidrólise em meio orgânico foram altas comparativamente às encontradas por SALUM *et al.* (2008) e ALMEIDA *et al.* (2008). SALUM *et al.* (2008), após a imobilização lipase de *Burkholderia cepacia* em Accurel EP-100 [25 mg/g (proteína/suporte) por 6 h] obtiveram atividade de hidrólise de 5 U g^{-1} para o substrato sintético palmitato de *p*-nitrofenila. Já a atividade de hidrólise obtida por ALMEIDA *et al.* (2008), para a

esterase *Pyrococcus furiosus* imobilizada, foi de apenas 4 U g^{-1} para o éster heptanoato de metillumbeferila.

TABELA 17 - ATIVIDADES DE HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO PARA Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA

Proteína/Accurel MP-1000	Atividade * (U g^{-1} meio aquoso)	Atividade ** (U g^{-1} meio orgânico)
5 mg/g	$197,4 \pm 9,4$	$219,3 \pm 28,3$

*Atividade determinada pelo método do titulométrico, utilizando trioleína em pH 7,5 a 30°C .

**Atividade de hidrólise em meio orgânico pelo método de Lowry-Tinsley com o substrato trioleína, 30°C .

5.6.2 Atividade de Esterificação

A atividade de esterificação de Lip-LifC6G9 foi determinada pela reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, utilizando os cossolventes *n*-heptano e *n*-hexano e as atividades foram de $36,2 \pm 5,9 \text{ U g}^{-1}$ e $32,2 \pm 1,9 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente (FIGURAS 40 e 41). A conversão em éster após 6 h foi de aproximadamente 95% para os dois cossolventes. Estes resultados são comparáveis com os da literatura e mostram que Lip-LifC6G9 imobilizada em Accurel pode ser utilizada em reações de esterificação.

SALUM *et al.* (2008) realizaram um estudo comparativo para a síntese do oleato de etila utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11, em três diferentes sistemas: imobilização em Accurel EP 100, encapsulação em micelas reversas e adição da enzima liofilizada diretamente ao meio reacional. Os autores observaram um rendimento maior (70% de conversão em éster após 10h), com *n*-heptano como cossolvente, sendo o rendimento da lipase imobilizada 5 vezes maior e 2 vezes maior que os encontrados para o sistema em micelas reversas e enzima liofilizada, respectivamente. Após uma otimização do sistema, esses autores obtiveram uma conversão de 100% em éster após 3 h. Os resultados iniciais obtidos por SALUM *et al.* (2008) são comparáveis aos obtidos para Lip-LifC6G9 (96% de conversão em éster após 6h) e abrem perspectivas para

otimização do sistema a fim de obter uma conversão mais rápida e livre de cossolvente assim como realizado por SALUM *et al.* (2008).

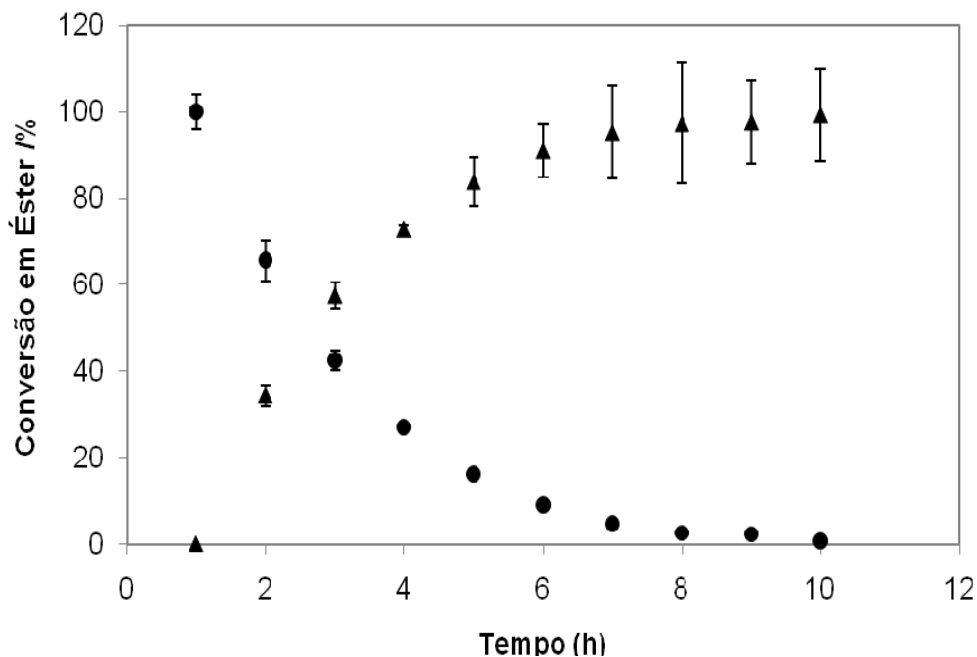


FIGURA 40 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM *N*-HEPTANO CATALISADA POR Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000

Meio reacional: 10 mL de *n*-heptano, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol.L⁻¹ de etanol, 70 U de catalisador (imobilizado). Condições: 40 °C e 180 rpm. Método de Lowry-Tinsley Legenda: (●) ácido oléico e (▲) oleato de etila.

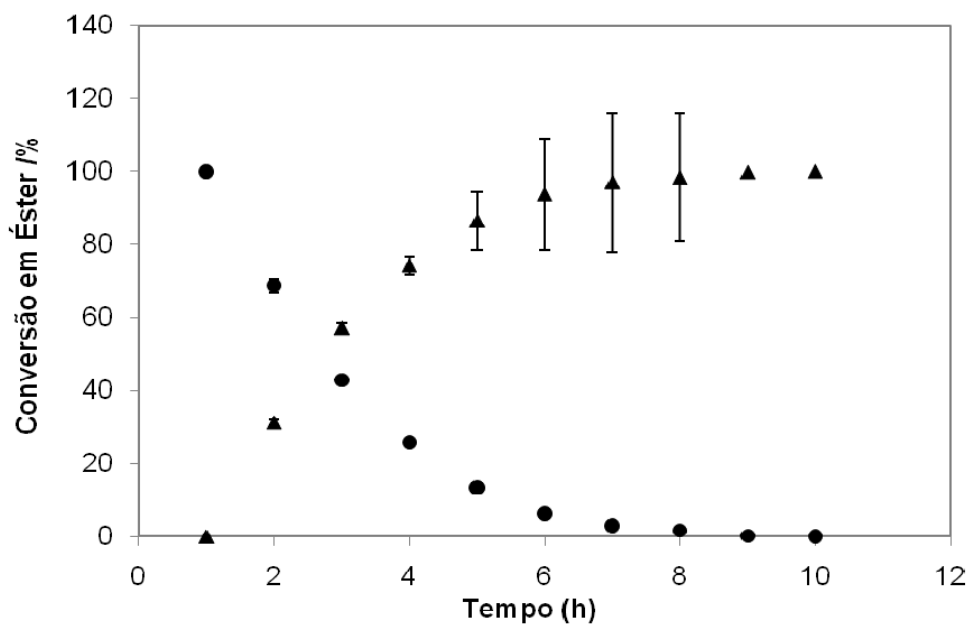


FIGURA 41 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM *N*-HEXANO CATALISADA POR Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000.

Meio reacional: 10 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol.L⁻¹ de etanol, 70 U de catalisador (imobilizado). Condições: 40 °C e 180 rpm. Método de Lowry-Tinsley Legenda: (●) ácido oléico e (▲) oleato de etila.

5.6.3 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Solventes Orgânicos

A estabilidade de Lip-LifC6G9 imobilizada foi determinada em 100% de solventes orgânicos polares e apolares de ampla faixa de log P, com incubação durante 4 e 8 h, a 30 °C. A enzima imobilizada apresentou maiores estabilidades em *n*-heptano (log P 4,0) (FIGURA 42), e em isopropanol (log P 0,28), com atividades residuais acima de 100% para ambos os tempos de incubação, mostrando uma ativação nestes solventes. Normalmente, para lipases, o valor de log P é o parâmetro mais utilizado para a escolha do solvente do meio reacional, pois quanto maior é este valor, maior é a atividade relatada para lipases (KRIEGER *et al.* 2004). Entretanto, os resultados obtidos para Lip-LifC6G9 mostram que esta afirmação deve ser vista com cautela, pois depende da enzima e do suporte utilizado.

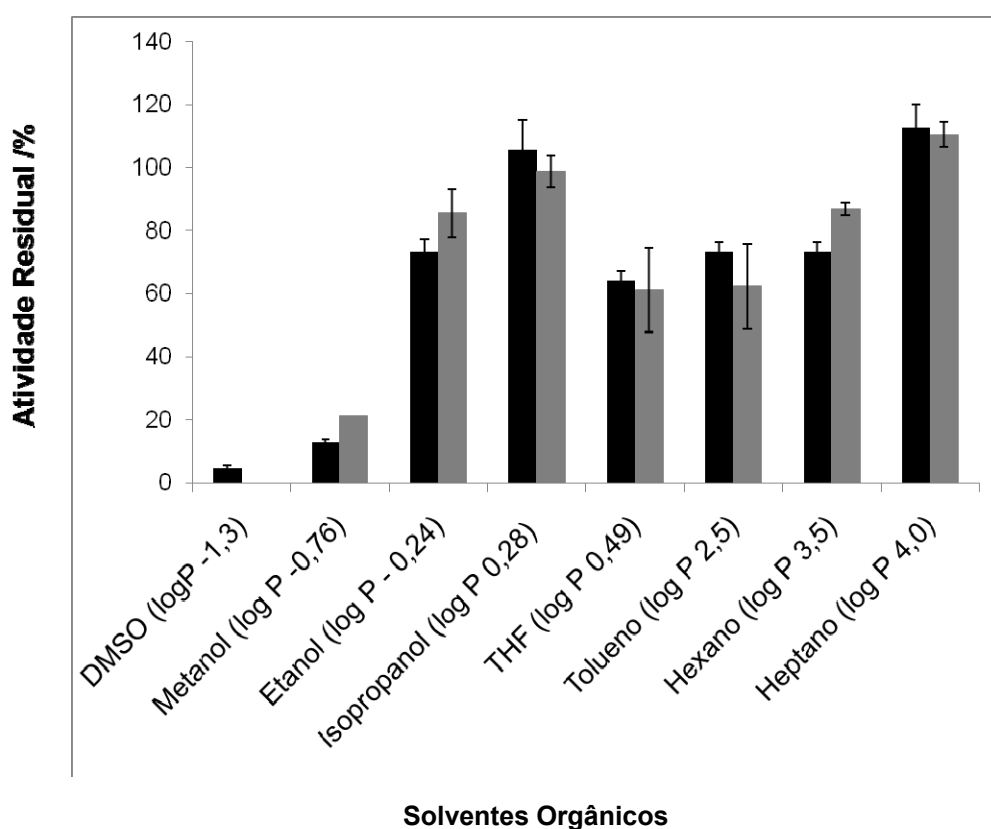


FIGURA 42 - ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA
Condições: Incubação de 4 h e 8 h a 30 °C nos respectivos solventes. Atividade de hidrólise em meio orgânico (*n*-heptano) determinada pelo método de Lowry-Tinsley com o substrato trioleína.
Legenda: Barra em cor preta: incubada por 4h e Barra em cor cinza: incubada por 8h.

Lip-LifC6G9 imobilizada também apresentou uma maior estabilidade (86%) em *n*-hexano ($\log P = 3,6$), comparativamente a lipase co-expressa com a foldase e imobilizada em celite-545, de *P. aeruginosa* CS2, incubada no mesmo solvente por 9 h a 30 °C, apresentando uma estabilidade de aproximadamente 63% (PENG *et al.* 2011).

Um resultado interessante de Lip-LifC6G9 imobilizada foi a estabilidade 100% em isopropanol ($\log P = 0,28$) e 80% em etanol ($\log P = -0,24$) comparativamente à baixa estabilidade, 20% em metanol ($\log P = -0,76$). Esses três álcoois apresentam $\log P$ diferentes, sendo o metanol o menor, conseqüentemente o mais polar entre os três, seguido do etanol e isopropanol. Possivelmente o metanol interage mais fortemente com a água de hidratação da enzima removendo-a e desnaturando a proteína (SIMON *et al.* 1998). Para o etanol esse efeito não é tão intenso, enquanto para o isopropanol (álcool secundário) esse não ocorre. O fato da enzima não desnaturar na presença do isopropanol permite que futuramente seja estudado o desempenho e enantiosseletividade da Lip-LifC6G9 imobilizada frente à álcoois alílicos secundários (resolução cinética) em reações de transesterificação como o trabalho desenvolvido por MOURE (2009).

A TABELA 18 traz uma comparação da estabilidade da enzima livre e imobilizada frente aos mesmos solventes. Embora o tempo de incubação, a proporção de solvente utilizado e a dosagem da atividade residual para os testes de estabilidade a solventes orgânicos tenham sido diferentes para enzima livre e imobilizada, é possível verificar que Lip-LifC6G9 imobilizada tem uma estabilidade maior que a enzima livre nos mesmos solventes como também já verificado por PENCREAC'H e BARATTI (1997) para a lipase de *B. cepacia* imobilizada em Accurel EP-100. Entretanto, em presença do solvente DMSO a enzima imobilizada teve uma estabilidade menor do que a da enzima livre. Uma possível explicação para esse resultado seria a presença do DMSO na enzima imobilizada após a secagem do material, uma vez que o procedimento de remoção do solvente se deu por incubação do imobilizado no dessecador por 16 h a 4 °C, temperatura que pode ter sido insuficiente para volatilização do DMSO, cuja pressão de vapor a 20 °C (0,45 mm Hg) é muito menor do que a da água (17,5 mm Hg) e do etanol (44 mmHg) (QIAN *et al.* 1995), o que fez com que o tempo de contato da enzima com DMSO aumentasse inativando totalmente a enzima.

TABELA 18 – COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EM SOLVENTES ORGÂNICOS DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA

ENZIMA LIVRE (incubada por 1,5h a 30 °C)				ENZIMA IMOBILIZADA (incubada por 4h a 30 °C)			
Solventes	Solvente (%)	Log P	Atividade* (%)	Solventes	Solvente (%)	Log P	Atividade** (%)
Etanol	75	-0,24	54,3	Etanol	100	-0,24	73
Isopropanol		0,28	65,9	Isopropanol		0,28	105
DMSO		-1,30	89,1	DMSO		-1,30	5
THF		0,49	34,9	THF		0,49	60

* Atividade residual em meio aquoso foi determinada pelo método do titulométrico utilizando tricaprilina, em pH 7,5, 30 °C.

** Atividade de hidrólise pelo método de Lowry-Tinsley com trioleína, a 30 °C.

5.6.4 Atividade Residual da Lipase Lip-LifC6G9 Imobilizada em Diferentes Temperaturas

Foi determinada a estabilidade de Lip-LifC6G9 imobilizada em três diferentes temperaturas, 30, 40 e 50 °C (FIGURA 43), após incubação no tampão Tris-HCl por 4 h. A enzima manteve sua atividade a 30 °C; 40 °C, a enzima reduz sua atividade em cerca de 30% e a 50 °C a enzima perde 40% da atividade. Embora uma das vantagens do processo de imobilização da enzima seja o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador (GUIZÁN, 2006), isso não foi observado para Lip-LifC6G9. Uma possível explicação para a diminuição da atividade é que a enzima pode estar sendo desorvida do suporte devido à sua incubação em meio aquoso, então, a estabilidade da enzima imobilizada a temperatura deveria ter sido realizada em um solvente hidrofóbico preferencialmente, como o que foi realizado por SEBRÃO *et al.* (2007), que determinaram a estabilidade à temperatura das lipases comerciais de *Pseudomonas sp* e de *R. oryzae* obtidas da Amano Enzyme Inc. e *Thermomices lanuginosus* obtida da Novozymes A/S imobilizadas em filme de caseinato de sódio e glicerol (CS/G). Investigou-se o efeito da temperatura entre 25 a 50 °C, por 24 h, na reação de esterificação do ácido oleico com *n*-pentanol tendo o *n*-hexano como cossolvente, obtendo-se os melhores resultados a 25 e 35 °C. Esse método de determinação da estabilidade da enzima utilizando uma reação padrão, por exemplo, de esterificação, pode ser

mais interessante, uma vez que indica a influência da temperatura para a aplicação que se deseja.

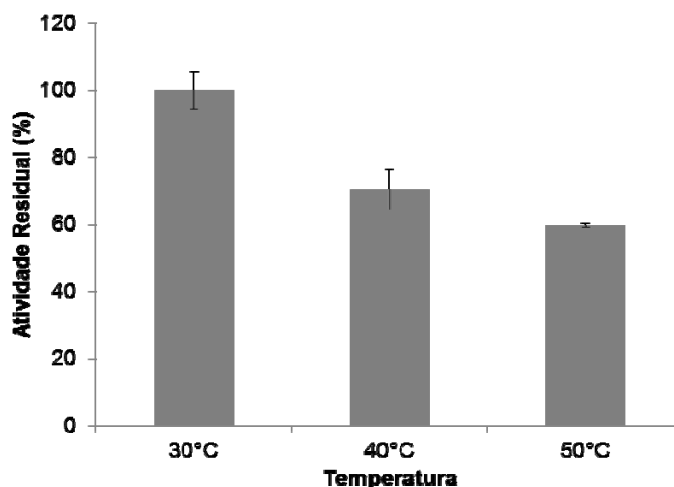


FIGURA 43 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ESTABILIDADE DE Lip-LifC6G9 IMOBILIZADA. Condições: Incubação por 4 h em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5. Atividade residual verificada em meio orgânico pelo método de Lowry-Tinsley com o trioleína, 30 °C.

Embora o tempo de incubação e a dosagem da atividade residual para os testes de estabilidade em diferentes temperaturas da enzima livre e imobilizada tenham sido diferentes 1,5 h e 4h, respectivamente, foi possível verificar que a atividade foi semelhante para as mesmas temperaturas. Isto é, a 30 °C a enzima apresentou 100% de atividade para ambas, já a 40 °C e 50 °C há uma redução de aproximadamente 10% da atividade residual para a enzima imobilizada em relação a livre (TABELA 19). Embora a imobilização represente em muitos casos um ganho de termoestabilidade para enzima imobilizada (BRADY *et al.* 1988, KIMURA *et al.* 1983) isso não foi observado para Lip-LifC6G9, além disso, a enzima livre apresentou uma atividade um pouco maior em relação à imobilizada devido ao tempo de incubação da enzima ter sido menor.

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES TEMPERATURAS DA LIPASE Lip-LifC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA

TEMPERATURA /°C	Atividade Residual (%)	
	Enzima Livre *	Enzima Imobilizada **
	(incubada por 1,5 h)	(incubada por 4h)
30	100	100
40	86	70
50	70	60

* Atividade residual em meio aquoso foi determinada pelo método titulométrico utilizando tricaprilina, em pH 7,5, 30 °C. ** Atividade de hidrólise pelo método de Lowry-Tinsley com trioleína, a 30 °C.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho resultou na clonagem, expressão, purificação e caracterização de uma nova lipase complexada com a sua foldase, denominada Lip-LifC6G9 e na determinação da estrutura cristalográfica da lipase LipC12, ambas obtidas de biblioteca metagenômica. Lip-LifC6G9 foi caracterizada na forma livre e na forma imobilizada, e apresentou características de atividade e estabilidade, tanto em meio aquoso como em meios orgânicos, que suportam a sua aplicação futura em biocatálise. LipC12 é a primeira lipase de metagenômica com estrutura determinada e o conhecimento de sua estrutura tridimensional pode viabilizar, através da engenharia genética, a criação de biocatalisadores melhorados, adequados à aplicação biocatalítica que se deseja. As principais conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho estão apresentadas a seguir.

Na etapa de seleção de clones com atividade lipásica, dois genes, um codificando uma nova lipase (LipC6G9) e outro codificando uma nova esterase (EstD12), foram encontrados através da triagem da biblioteca metagenômica SCGA. Além disso, dois genes de foldases (*lifC6G9* e *lifC12*) foram identificados, um associado à lipase (*lipC6G9*) e outro à esterase (*lipD12*). Todos os quatro genes foram seqüenciados.

A seqüência dos genes *lipC6G9* e *lifC6G9* mostrou uma identidade de aproximadamente 96% e 77%, respectivamente, com a lipase e a foldase de *Aeromonas veronii* B565, cujas seqüências estão depositadas em banco de dados (NCBI). A seqüência dos genes *EstD12* e *lifD12* mostrou uma identidade de aproximadamente 68% e 41% com a lipase e foldase, respectivamente, de *Chromobacterium violaceum*.

Os genes *lipC6G9* e *lifC6G9* foram amplificados e clonados nos vetores pET28a(+), pET29b(+) e pT7-7. Foram realizados testes de expressão e atividade para combinações individuais e co-expressões da lipase e foldase. Os testes de expressão e atividade mostraram que a lipase LipC6G9 precisa ser expressa concomitantemente com a foldase LifC6G9 para exibir atividade.

A co-expressão pET28a(+)-*lipC6G9* com pT7-7-*lifC6G9* N-truncadas (denominada de Lip-LifC6G9) foi superexpressa e purificada; após a purificação, a lipase LipC6G9 permanece complexada à foldase LifC6G9.

Informações filogenéticas da lipase Lip-LifC6G9 permitem classificá-la na família I.1, que é a que pertencem as lipases de *P. aeruginosa*, lipases desta família são conhecidas por apresentarem consideráveis diferenças de enantiosseletividade e regiosseletividade, apesar do elevado grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos.

Os estudos de caracterização cinética da lipase Lip-LifC6G9 livre mostraram que a enzima possui preferência por substratos de cadeia média (tricaprilina, 1500 U mg⁻¹) e curta (tributirina, 1800 U mg⁻¹), e também apresenta atividade para o substrato de cadeia longa (trioleína, 820 U mg⁻¹), o que a caracteriza como uma lipase. Lip-LifC6G9 livre apresentou resultados interessantes de atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH (entre 6,0 a 10,5) e estabilidade em diferentes solventes, inclusive em DMSO, o que evidencia seu potencial para aplicação em diversas reações orgânicas.

Lip-LifC6G9 foi imobilizada em Accurel MP-1000 com uma eficiência de 68%, com 5 mg de proteína por g de suporte e 24 h de contato. A enzima imobilizada apresentou ativação em *n*-heptano, com retenção de atividade (R) de 248%. Lip-LifC6G9 imobilizada apresentou uma atividade de hidrólise em meio orgânico e em meio aquoso de aproximadamente 200 U g⁻¹ e foi estável principalmente nos solventes *n*-heptano e isopropanol, o que abre perspectivas de catálise enzimática em diversos meios reacionais utilizando esses cossolventes. Lip-LifC6G9 imobilizada também apresentou uma atividade de esterificação de 36 U g⁻¹ com conversão de 95% a oleato de etila após 6 h de reação.

Com relação à determinação da estrutura tridimensional da lipase LipC12, verificou-se que a enzima é a primeira lipase de metagenômica e a segunda lipase pertencente à família I.1 (mesma família a que pertence PAL) com estrutura tridimensional determinada.

A determinação estrutural mostrou também que LipC12 é uma α/β -hidrolase e que apresenta uma baixa identidade com as estruturas de lipases depositadas no PDB; a mais parecida apresenta 47% de identidade e trata-se da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (1EX9). Os resíduos que compõem a tríade catalítica

de LipC12 são Ser⁸³, Asp²³⁸ e His²⁶⁰. Sua estrutura tridimensional identifica uma ligação cis-peptídica, entre Gln²⁶⁶-Leu²⁶⁷, um sítio de ligação para íon cálcio, próximo aos resíduos Asp²¹⁷ e Asp²⁶², embora este não esteja presente na estrutura cristalográfica. LipC12 apresenta uma única cisteína (Cys⁸⁹) na estrutura. Estudos comparativos de LipC12 com 1EX9 indicam que ela não apresenta uma ligação dissulfeto conservada em famílias de lipases bacterianas I.1 e I.2, tendo em sua posição dois resíduos tirosina (Tyr¹⁸⁴) e triptofano (Trp²⁴⁴).

7. PERSPECTIVAS

Os resultados da estrutura tridimensional LipC12 e a caracterização de Lip-LifC6G9 livre e imobilizada são bastante promissores quando comparados com outras lipases de metagenômica, abrindo perspectivas para sua aplicação em diversos processos biocatalíticos. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

Estudos de *docking*⁶ e estudos de dinâmica molecular para LipC12, uma vez que sua estrutura tridimensional determinada faculta o planejamento de mutações sítio dirigidas para melhoria de sua atividade e especificidade, podendo-se construir um biocatalisador ainda melhor.

Aprofundamento dos estudos envolvendo aplicações de Lip-LifC6G9 imobilizada em Accurel-MP1000 em reações de esterificação e transesterificação a fim de obterem-se maiores rendimentos e sem a presença de cossolventes.

Determinação da enantiosseletividade de Lip-LifC6G9 livre e imobilizada, em reações de hidrólise e de esterificação, visando a sua aplicação em reações de resolução de racematos.

Imobilização de Lip-LifC6G9 em outros suportes, com objetivo de aumentar a atividade e estabilidade da enzima, possibilitando sua reutilização em reações de síntese, esterificação ou transesterificação.

Realização de ensaios de cristalização do complexo Lip-LifC6G9 a fim de determinar-se a estrutura tridimensional do complexo, com o objetivo de obter mais informações a respeito da interação lipase-foldase, visto que a única estrutura tridimensional de um complexo lipase-foldase publicada é para lipase de *B. glumae*, que pertence à família de lipases bacterianas I.2, diferente de LipC6G9, que pertence à família I.1.

⁶ O *docking* de ligantes a um receptor (proteína), é uma técnica que permite selecionar computacionalmente, com base no sítio ativo, compostos (inibidores, substratos) mais específicos para a enzima, uma vez que a estrutura da proteína é conhecida, permitindo uma rápida identificação sem a realização de bioensaios (FOSTER, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.
- AFONINE, P.V.; GROSSE-KUNSTLEVE R.W.; ADAMS P.D. The Phenix refinement framework. **CCP4 Newsletter on Protein Crystallography**, v. 42, 2005.
- AHMAD, S.; KAMAL, M. Z.; SANKARANARAYANAN, R.; RAO, N. M. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: *In vitro* evolution and structural insight. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, p. 324-340, 2009.
- AKBARI, N.; KHAJET, K.; REZAIE, S.; MIRDAMADI, M.; SHAVANDI, M.; GHAEMI, N. High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of recombinant enzyme through in vitro refolding. **Protein Expression and Purification**, v.70, p.75-80, 2010.
- AKRIM, M.; BALLY, M.; BALL, G.; TOMMASSEN, J.; TEERINK, H.; FILLOUX, A.; LAZDUNSKI, A. Xcp-mediated protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of two additional genes and evidence for regulation of xcp gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 10, p. 431–443, 1993.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A. ; CORDOVA, J. ; ZAMORA, P. P. ; KRIEGER, N . Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology** . v. 48, p. 28-35, 2010.
- AL-DURI, B.; YONG, Y.P. Lipase immobilisation: Equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports“, **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207-215, 2000.
- ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R.V.; PEIXOTO, B., LIMA, C. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O .B.; ANTUNES, O. A.C.; FREIRE, D. M.G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 531-537, 2008.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databasesearch programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- AMADA, K.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization of a family 1.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS 38. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 1478, p. 201–210, 2001.
- ANGKAWIDJAJA, C., MATSUMURA, H., KOGA, Y., TAKANO, K., KANAYA, S. X-ray Crystallographic and MD Simulation Studies on the Mechanism of Interfacial Activation of a Family I.3 Lipase with Two Lids. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, p. 82–95, 2010.
- ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2804–2817, 2006.
- ARNOLD, F. H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. **Nature** v. 409, p. 253-257, 2001.
- ARPIGNY, J. L; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v.343, p.177-183, 1999.
- ARROYO, M. Immobilizaco de enzimas. Fundamentos, mtodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n. 2, p. 23-29, 1998.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Properties of free and immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 276- 280, 1999.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p. 630-635, 1997.
- BARON, A. M.; ZAGO, E. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 19-24, 2011.
- BARON, A. M. **Preparao e caracterizao de lipases imobilizadas para utilizao em biocatlise**. Tese de Doutorado. Programa de Ps Graduao em Qumica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008..

- BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium corylophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 34, n. 1, p. 25-32, 2005.
- BARTON, G.J. ALSCRIPT - A Tool to Format Multiple Sequence Alignments. **Protein Engineering**, v.6, p.37-40, 1993.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FÉRNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, p. 486-493, 1998.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. . **Journal of Molecular Biology**, v.340, p. 783-795, 2004.
- BERTRAM, M.; HILDEBRANDT, P.; WEINER, D. P.; PATEL, J. S.; BARTNEK, F.; HITCHMAN, T.; BORNSCHEUER, U. T. Characterization of Lipases and Esterases from Metagenomes for Lipid Modification. **Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)**, v.85, p.47–53, 2008.
- BEVILAQUA, J. V.; PINTO, J. C.; LIMA L. M.; BARREIRO, E. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 103-110, 2004.
- BLOW, D. **Outline of Crystallography for Biologists**. 3 ed. Oxford University Press, 2003. 236p.
- BOND C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section A**, p. 510-512, v.65, 2009.
- BORNSCHEUER, T.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolases in Organic Synthesis, Regio- and **Stereoselective Biotransformations**, 2nd edn, Wiley- VCH GmbH & Co.KGaA, pp. 61-183, 2006.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.73-81, 2002.
- BÖTTCHER, D. AND BORNSCHEUER, U.T. Protein engineering of microbial enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p. 274–282, 2010.

- BOURNE, Y.; MARTINEZ, C; KERFELEC, B; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CAMBILLAU, C. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.5, p.709-711, 1994.
- BOUTAIBA, S.; BHATNAGAR, T.; HACENE, H.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.41, p. 21-26, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.; CHRISTIANSEN, L; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L; MENGE, U.. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767- 770, 1990.
- BRADY, C.; METCALFE, L.; SLABOSZEWSKI, D.; FRANK, D. Lipase immobilized on a hydrophobic microporous supports for the hydrolysis of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCs)**, v. 65, p. 917–921, 1988.
- BRENNER, S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two proteins. **Nature**, v. 334, p. 528–530, 1988.
- BRUMLIK, M. J.; van der GOOT, F. G.; WONG, K. R.; BUCKLEY, T. The disulfite bond in the *Aeromonas hydrophila* Lipase/Acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. **Journal of Bacteriology**, v.21, p. 3116-3121, 1997.
- BYUN, J.-S., RHEE, J.-K., KIM, N.D., YOON, J., KIM, D.-U., KOH, E., OH, J.-W., CHO, H.-S Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties. **BMC Structural Biology**, v.7, p. 47, 2007.
- CAREY, F. A; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry .Structure and Mechanisms**, 2008, 1199 p.
- CARRASCO-LOPEZ, C.; GODOY, C.; DE LAS RIVAS, B.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M. GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; HERMOSO, J. A. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, 2009.

- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F.J. BIZACO, R.; MACEDO, G.A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, p. 614-621, 2005.
- CHALKLEY, R. J.; BAKER, P. R.; HUANG, L.; HANSEN, K. C.; ALLEN, N. P.; REXACH, M.; BURLINGAME, A. L. Comprehensive analysis of a multidimensional liquid chromatography mass spectrometry dataset acquired on a quadrupole selecting, quadrupole collision cell, time-of-flight mass spectrometer: II. New developments in Protein Prospector allow for reliable and comprehensive automatic analysis of large datasets. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1194-204, 2005.
- CHEN, C. K.-M.; LEE, G.-C.; KO T.-P.; TING, G. R.; HUANG, L.-M.; LIU, H.-J, HO, Y.-F.; SHAW, J.-F.; WANG, A. H.-J. Structure of the *Alkalo hyperthermophilic Archaeo globusfulgidus* Lipase Contains a Unique C-Terminal Domain Essential for Long-Chain Substrate Binding. **Journal of Molecular Biology**, v.390, p. 672–685, 2009.
- CHU, X; HE, H; GUO, C; SUN, G. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.80, p.615–625, 2008.
- CLEASBY, A.; GARMAN, E.; EGMOND, M. R.; BATENBURG, M. Crystallization and preliminary X-ray study of a lipase from *Pseudomonas glumae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 1, p. 281-283, 1992.
- COLTON, I.J., YIN, D.T., GROCHULSKI, P., KAZLAUSKAS, R.J Molecular Basis of Chiral Acid Recognition by *Candida rugosa* Lipase: X-Ray Structure of Transition State Analog and Modeling of the Hydrolysis of Methyl 2-Methoxy-2-phenylacetate. **Advanced Synthesis & Catalysis**,v. 353, p. 2529–2544, 2011.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p.21-30, 2010.
- COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p. 514-523, 2010.
- CUI, S.-S.; LIN, X.-Z.; SHEN, J.-H. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase *Lip-948*. **Protein Expression and Purification**, v.77, p.166-172, 2011.

- CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G, SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DELANO, W.L. **The PyMOL Molecular GraphicsSystem**. San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y.; GREEN, R.; KOBOS, P. M.; JOERGER, R.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil- water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 524-534, 1994.
- DIA, R-M.; BELAQZIZ, R.; ROMANE, A.; ANTONIOTTI, S.; DUÑACH, E. Flavouring and odorant thiols from renewable natural resources by InIII-catalysed hydrothioacetylation and lipase-catalysed solvolysis. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 2164–2167, 2010.
- ELEND C., SCHMEISSER, C. HOEBENREICH, H..STEELE, H.L. STREIT W.R, Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 370–377, 2007.
- ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J. D. ; STEELE, H. L.; REYMOND, J.-L.; JAEGER, K.-E.; STREIT, W. R. Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3637–3645, 2006.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. **Acta Crystallographica Section D**, p. 2126-2132, 2004.
- ERICSSON, D.J., KASRAYAN, A., JOHANSSON, P., BERGFORS, T., SANDSTROM, A.G., BACKVALL, J.E., MOWBRAY, S.L. X-Ray Structure of *Candida Antarctica* Lipase a Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109, 2008.
- EWING B, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 3, p. 186-94, 1998.
- FABER, K.; **Biotransformation in Organic Chemistry**, Springer-Verlag: Berlin, 1997.

- FAORO, H.; GLOGAUER, A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 750–755, 2011.
- FAN, X.; LIU, X.; HUANG, R.; LIU, Y. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach, **Microbial Cell Factories**, v.11, p. 31-33, 2012.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*. Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p.197–212, 2010.
- FERNANDEZ, S., JANNIN, V., RODIER, J-D., RITTER, N., MAHLER, B., CARRIÈRE, F. Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol®, medium chain glycerides and PEG esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 633–640, 2007.
- FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Issooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.
- FERRER M.; BELOQUI A.; TIMMIS K.; GOLYSHIN P. N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.109-123, 2009.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; FUENTES, G.; CRUCES, M. A.; ANDERSEN, L.; KIRK, O.; CHRISTENSE, M.; BALLESTEROS, A. Effect of the immobilisation method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, p. 63–71, 2002.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.
- FOSTER, M.J. Molecular modelling in structural biology. *Micron*, v.33, p.365-384, 2002.
- FREIRE, D.M.G. **Imobilização de Amiloglicosidase em Quitina: Caracterização e Testes em Reatores Contínuos de Leito Expandido.** Dissertação de Mestrado. Engenharia Química/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: 1988.

- GIACOVAZZO, G. **Fundamentals of crystallography**. Oxford University Press, 1992.
- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p. 571-607, 2005.
- GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1040–1046, 2008.
- GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 54, 2011.
- GLOGAUER, A. **Desenvolvimento de bibliotecas metagenômicas para a pesquisa de lipases com características especiais**. Curitiba: 2011. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- GONÇALVES, A.P.V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 1999. Tese (Doutorado em biotecnologia). Universidade Técnica de Lisboa,.
- GOTOR V.; BRIEVA, R.; GOTOR-FERNANDEZ, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 40, p. 111–120, 2006.
- GROCHULSKI, P.; BOUTHILLIER, F.; KAZLAUSKAS, R. J.; SERREQUI, A. N.; SCHRAG, J. D.; ZIOMEK, E.; CYGLER, M. Analogs of Reaction Intermediates Identify a Unique Substrate Binding Site in *Candida rugosa* Lipase. **Biochemistry**, v. 33, p. 3494- 3500, 1994.
- GROCHULSKI, P. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12843-12847, 1993.
- GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In Guisan, J. M. editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, p.1-13, 2006.

- GUNCHEVA, M., ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p 1–2, 2011.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.763–781, 2004.
- HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, B. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics application of genomics to uncultured microorganisms, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 669–685, 2004.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, S. F.; BRADY, J.; CLARDY, R. M. Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology** v. 5, p. 245-249, 1998.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. Review. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4836 - 4844, 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 235-251, 2006.
- HOBSON, A. H.; BUCKLEY, C. M.; AAMAND, J. L.; JORGENSEN, S. T.; DIDERICHSEN, B.; McCONNELL, D. J. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. **PNAS**, v. 90, p.5682–5686, 1993.
- HOOFT, R. W. W.; SANDER, C.; VRIEND, G. What_check: Errors in protein structures. **Nature** v.381, p.272, 1996.
- HORTON, J.R., QIAN, Z., JIA, D., LUTZ, S.A., CHENG, X. Structural redesign of lipase B from *Candida antarctica* by circular permutation and incremental truncation. **Journal of Molecular Biology**, v.393, p. 191-201, 2009.
- HOUE A, KADEMI A, LEBLANC D. Lipases and their industrial applications -an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, p. 155-170, 2004.
- HUNG, S-K.; CHEN, S-Y.; LIU, H-F.; TSAI, B-R.; CHEN, H-W.; HUANG, C-Y.; LIAO, J-L.; SUN, K-H.; TANG, S-J. C-Terminal Region of *Candida rugosa*

- Lipases Affects Enzyme Activity and Interfacial Activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5396–5401, 2011.
- JAEGER K. E.; EGGERT T. Lipases for biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p.315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JEON, J. H.; KIM, J. T.; KIM, Y. J.; KIM, H. K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S. J.; LEE, J. H. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 865–874, 2009a.
- JEON, J. H.; KIM, J. T.; KANG, S. G.; LEE, J. H.; KIM, S. J. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome, **Marine biotechnology**, v. 11, p. 307–316, 2009b.
- JONES, T.A. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. **Acta Crystallographica Section A**, v.47, P.110-119,1991.
- JUNGANG,L.; KEGUI, Z.; WENJUN, H. Cloning and biochemical characterization of a novel lipolytic gene from activated sludge metagenome, and its gene product. **Microbial Cell Factories**, v.9, p. 81-83, 2010.
- KABSCH, W. XDS: Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p.795-800, 1994.
- KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogenbonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 12, p. 2577-637, 1983.
- KAETHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1525–1530, 2005.

- KHATTABI, M. E.; GELDER, P. V.; BITTER, W.; TOMMASSEN, J. Role of lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 26885-26891, 2000.
- KIM, H. Y., KWON, E. J., KIM, S. K., JEONG, Y.S., KIM, J., YUN, H.D., KIM, H. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 45–49, 2010.
- KIM, Y-J.; CHOI, G-S.; KIM, S-B.; YOON, G-S.; KIM, Y-S.; RYU, Y-W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 315–323, 2006.
- KIM, H. K.; JUN, Y. J.; CHOI, W. C.; RYU, H. S.; OH, T. K.; LEE, J. K. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 349-355, 2004.
- KIM H. K.; CHOI, H. J.; KIM, M. H.; OH, T.K. Expression and characterization of Ca^{+2} independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1583, p. 205-212, 2002.
- KIMURA Y, TANAKA A, SONOMOTO K, NIHIRA T, FUKUI S. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 112–70, 1983.
- KLEYWEGT, G. J.; JONES, T.A. xDlMAPMAN and xDlDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D**, v.52, p.826-828, 1996.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature** v.409, p.241-246, 2001.
- KOHNO, M.; ENATSU, M.; FUNATSU, J.; YOSHIIZUMI, M.; KUGIMIYA, W. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and its structural interpretation. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 203–210, 2001.
- KOJIMA Y, KOBAYASHI M, SHIMIZU S.A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: gene cloning, overproduction, renaturation–activation, two-step purification and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p.,242–249, 2003.

- KOLLING, D. J.; SEGUINO, W. A.; BROD, F. C. A.; ARISI, A. C. M. Immobilization of a Recombinant Esterase from *Lactobacillus plantarum* on Polypropylene Accurel MP-1000. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, p. 304–312, 2011.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; de LIMA, V.M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology** v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.
- KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38-44, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LÄMMLE, K. ZIPPER, H. BREUER, M. HAUER B., BUTA, C. BRUNNER, G. RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning, **Journal of Biotechnology**, v.127, p. 575–592, 2007.
- LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L.; HECHT, H-J.; SPENER, H.; SCHMID, R. D.; SCHOMBURG, D. Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 Refined at 1.6 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.259, p. 704- 717, 1996.
- LARISSEGER-SCHNELL, B.; GLUECK, S. M.; KROUTIL, W.; FABER, K. Enantio-complementary deracemization of (±)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and (±)-3-phenyllactic acid using lipase-catalyzed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization. **Tetrahedron**, v. 62, p. 2912-2916, 2006.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283, 1993.
- LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 7406-7409, 2006.
- LEE, H-K.; AHN, M-J.; KWAK, S-H.; SONG, W-H.; JEONG, B-C. Purification and Characterization of Cold Active Lipase from Psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4 **The Journal of Microbiology**, p.22-27, 2003.

- LIU, D.; SCHMID, R. D.; RUSNAK, M. Functional expression of *Candida Antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm – A screening system for a frequently used biocatalyst. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1024- 1032, 2006.
- LIU, K. L.; WANG, J. Q.; BU, D. P.; ZHAO, S. G.; McSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 384, p.605-611, 2009.
- LÓPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n.1, p. 1-10, 2005.
- LORENZETTI, D. L. **Estudo de aplicação de lipases em formulações cosméticas**, 2007. Curitiba: 2007. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná.
- LORENZ, P. L. K; NIEHAUS, F.; ECK J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: Accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology** v. 13, p. 572-577, 2002.
- LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of Biotechnology**, v.54, p. 113-120, 1997.
- LOZANO, P.; DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Sythesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 214,p. 113-119, 2004.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.
- MCREE, D.E. **Practical Protein Crystallography**. Academic Press, 1999.
- MADAN, B., AND MISHRA, P. Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 597–604, 2010.
- MAJEWSKA, P.; KAFARSKIA, P.; LEJCZAKA, B.; BRYNDAL, L.; LIS, T. An approach to the synthesis and assignment of the absolute configuration of all

- enantiomers of ethyl hydroxyl (phenyl) methane (P-phenyl) phosphinate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 2697-2701, 2006.
- MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipases reactors for modification of fats and oils. A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, n.12, p. 890-910, 1990.
- MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. T. Understanding Structural Features of Microbial Lipases -An Overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.
- MARHUENDA-EGEA F. C; BONETE M. J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. **Current Opinion in Biotechnology** v.13, p.385-389, 2002.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- MATSUMAE, H.; SHIBATANI, T. Purification and characterization of lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77, p. 152-158, 1994.
- MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, p. 491-497, 1968.
- McCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 658-674, 2007.
- McPHERSON, A. **Crystallisation of Biological Macromolecules**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1999.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R de L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 503- 511, 2012.
- MEILLEUR, C; HUPÉ, J.F.; JUTEAU, P.; SHARECK, F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.39, p. 853-861, 2009.

- METZGER J. O.; BORNSCHEUER U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Applied Microbiololy& Biotechnology**, v.71, p. 13–22, 2006.
- MOURE, V. R. **Estudo da enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na resolução de álcoois alílicos secundários**. Curitiba: 2009. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- MÜLLER-SANTOS, M. **Caracterização Bioquímica de uma Esterase Halofílica de *Haloarcula marismortui***. Curitiba: 2009. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAM, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** , v. 7, p. 57-66, 2002.
- NAIK, S.; BASU, A.; SAIKIA, R.; MADAN, R.; PAUL, P.; CHATERJEE, R.; BRASK, J.; SVENDSEN, A. Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 18–23, 2010.
- NAM, K. H.; RHEE, K. H.; LEE, W. H.; JEONG, B-C.; SONG, H. K.; HWANG, K. Y. Biochemical and structural analysis of hormone-sensitive lipase homolog EstE7; Insight into the stabilized dimerization of HSL-homolog proteins. **Korean Chemical Society**, v.31,p. 9, 2010.
- NARDINI, M.; LANG, D.A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B.W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation.The prototype for family I.1 of bacterial lipases. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 31219-31225, 2000.
- NEELAMBARI, V.; VASANTHABHARATHI, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. **Research Journal of Microbiology**, v.6, p. 658-668, 2011.
- NINI, L.; SARDA, L.; COMEAU, L. C.; BOITARD, E.; DUBÈS, J. P. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1534, p. 34-44, 2001.
- OGINO, H.; INOUE S.; AKAGI, R.; YASUDA, M.; DOUKYU, N.; ISHIMI, K. Refolding of a recombinant organic solvent-stable lipase, wich is overexpressed and forms an inclusion body, and activation with lipase-specific foldase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 507-511, 2008.

- OGINO, H.; KATOU, Y.; AKAGI, R.; MIMITSUKA, T.; HIROSHIMA, S.; GEMBA, Y.; DOUKYU, N.; YASUDA, M.; ISHIMI, K.; ISHIKAWA, H. Cloning and expression of gene, and activation of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Extremophiles**, v. 11, p. 809-817, 2007.
- OGINO, H.; NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUGIMURA, N.; YASUDO, M. Purification and characterization of organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p. 451–457, 2000.
- OGINO H, ISHIKAWA H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v, 91, p109–116, 2001.
- OH, B.; KIM, H.; LEE, J.; KANG, S.; OH, T. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 385-392, 1999.
- OTTEN, L. G., HOLLMANN, F., ARENDS I. W.C.E. Enzyme engineering for enantioselectivity: from trial-and-error to rational design? **Trends in Biotechnology**, v.28 n.1, 2010.
- PAINTER, J.; MERRITT, E. A. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, p. 109-111, 2006.
- PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279-286, 2002.
- PARK, H. J.; JEON, J. A.; KANG, S. G.; LEE, J. H.; LEE, S. A.; KIM, H. K. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EML28 from deep-sea sediment metagenome. **Protein expression & purification**, v.52, n.2, p. 340-347, 2007.
- PAUWELS, K.; GELDER, P.V Affinity-based isolation of a bacterial lipase through steric chaperone interactions . **Protein Expression and Purification**, v.59, p. 342–348, 2008.
- PAUWELS, K., WYNS, L., TOMMASSEN, J., SAVVIDES, S.N., VAN GELDER, P. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13, p. 374-375, 2006.

- PAUWELS, K; LORIS, VANDENBUSSCHE, G.; RUYSSCHAERT, J.M; WYNS, L.; VAN GELDER, P. Crystallization and crystal manipulation of a steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, p. 61, p. 791–795, 2005.
- PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. MiniReview. **FEMS Microbiology Letters**, v.152, p. 1-10, 1997.
- PENG, P.; LIN, J.; WEI, D. Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase. **Appl Biochem Biotechnol**, v.165, p.926-937, 2011.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 833–841, 2002.
- PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 3, p. 263-281, 1992.
- PUECH-GUENOT, S.; LAFQUIÈRE, V.; GUIEYSSE, D.; BURTIN, L. L.; MONSAN, P.; REMAUD-SIMÉON, M. Small-scale production of *Burkholderia cepacia* ATCC21808 lipase adapted to high-throughput screening. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 13, p. 72-79, 2008.
- QIAN Z, HORTON JR, CHENG X, LUTZ S. Structural redesign of lipase B from *Candida antarctica* by circular permutation and incremental truncation. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, p.191-201, 2009.
- QIAN, X.; HAN, B.; LIU, Y.; YAN, H.; LIU, R. Vapor pressure of dimethyl sulfoxide and water binary system. **Journal of Solution Chemistry**, v. 24, n. 11, 1183-1189, 1995.
- QUYEN, D.T.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BLT2 in *Pichia pastoris* and some properties of recombinant lipase. **Protein Expression and Purification**, v. 28, p. 102–110, 2003.
- QUYEN, D. T., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMID, R. D. High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 787–794, 1999.

- RASHAMUSE, K. MAGOMANI, V. RONNEBURG T., BRADY, D. A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous b-lactamase activity on nitrocefin, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 491–500, 2009.
- READ, R.J. Sigmaa - Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. **Acta Crystallographica Section A**, v.42, P.140-149, 1986.
- RHEE, J.K. AHN, D.G. KIM Y.G., OH J.W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 817– 825, 2005.
- RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN,T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.
- ROSENAU ,F.; TOMMASSEN, J.; JAEGER, K. E. Lipase-Specific Foldases. **ChemBioChem**, v..5, p. 152-161, 2004.
- ROSENAU ,F.; JAEGER, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanism of secretion. **Biochimie**, v. 82, p. 1023-1032, 2000.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.
- SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P. ; BAREA, B. ; YAMAMOTO, C. I. ; CÔCCO, L. C. ; MITCHELL, D. A. ; KRIEGER, N . Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11.**Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.
- SALUM, T. F. C.; BARON, A. M. ; ZAGO, E.C. ; TURRA, V. ; BARATTI, J. C. ; MITCHELL, D. A. ; KRIEGER, N. An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformation**,, v. 26, p. 197-203, 2008.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed.** Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SÁNCHEZ-OTERO, M.G.; QUINTANA-CASTRO, R.; MORA-GONZÁLEZ, P.C.; MARQUEZ-MOLINA, O.; VAERIO-ALFARO, G.; OLIART-ROS, R. Enzymatic reactions and synthesis of *n*-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. **Environmental Technology**, v. 31, n.10, p. 1101–06, 2010.
- SANGEETHA, R. ARULPANDI I. AND GEETHA, A. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. **Research Journal of Microbiology**, v.6,p.1-24, 2011.
- SCHMIDT-DANNERT, C.; RUA, M. L.; ATOMI, H.; SCHMID, R. D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. **Biochimica et Biophysica Acta-BBA**, v. 1301, p. 105–114, 1996.
- SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and α/β hidrolases fold. **Methods Enzymology**, 284, A, Academic Press, 1997.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M.A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, p. 575, 1993.
- SÉVERAC, E.; GALY, O.; TUROND, F.; PANTELE, C. A.; CONDORET, J-S.; MONSAN, P.; MARTYA, A. Selection of Cal B immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 61-70, 2011.
- SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. da G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1182-1187, 2007.
- SHARMA, D., B. SHARMA AND A.K. SHUKLA, Biotechnological approach of microbial lipase: A review. **Biotechnology**, v.10, p. 23-40,2011.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHU, Z-Y.; JIANG, H.; LIN, R-F.; JIANG, Y-M.; LIN, L.; HUANG, J-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 1–8, 2010.

- SIMON, L. M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.4, n 1-2, p. 41-45, 1998.
- SJOLING, S.; HARDEMAN, F. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 524–534, 2007.
- SKOURIDOU, V. CHRYSINAB, E. D.; STAMATISC, H.; OIKONOMAKOSB, N. G.; KOLISIS, F. N. Kinetic and modelling studies on the lipase catalysed enantioselective esterification of (±)-perillyl alcohol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, p. 9-12, 2004.
- SOLIMAN, N. A.; KNOLL, M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SCHMID, R. D.; LANGE, S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. **Process Biochemistry**, v.42, p. 1090–1100, 2007.
- STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **J. Appl. Cryst.**, 41, 641-643, 2008.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 168, p. 1070-1074, 1986.
- SULONG, M., A. Novel Organic Solvent Tolerant Lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular Expression of a Novel OST Lipase Gene. **Protein Expression and Purification**, v. 49, n. 2, p. 190–195, 2006.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TRAUB, P. C., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMITT, J., SCHMID, R. D. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonas* sp. KWI 56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.198–204, 2001.

- UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v.235, p.790-792, 1994.
- USAMI, R.; FUKUSHIMA, T.; MIZUKI, T.; INOUE, A.; YOSHIDA, Y.; HORIKOSHI, K. Organic solvent tolerance of halophilic archaea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.67, p.1809-1812, 2003.
- VAGUINE. Scheck: a unified set of procedure for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with atomic model. **Acta Crystallographica Section D**, v.55, p.191–205, 1999.
- VELU, N.; DIVAKAR, K.; NANDHINIDEVI, G.; GAUTAM, P. Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, p. 45-50, 2012.
- VERGER, R., "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts, **Biotechnology**, v.15, p.32-38, 1997.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VITOLO, M., Imobilização de enzimas, In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHIMIDELL, W., (eds), Biotecnologia Industrial, **Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, pp. 391-404, 2001.
- WEI, P.; BAI, L.; SONG, W.; HAO, G. Characterization of two soil metagenome derived lipases with high specificity for p-nitrophenyl palmitate, **Archives of Microbiology**, v.191, p. 233–240, 2009.
- WESTBROOK, J. ValidationPDB - Validation of protein structures for protein data bank. **Methods in Enzymology**, 2003.
- WESTERMEIER, R., NAVEN, T. **Proteomics in Practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Darmstadt-German, Wiley-VCH Verlag-GmbH Press, 316 p, 2002.
- WILHELM, S.; ROSENAU, F.; BECKER, S.; BUEST, S.; HAUSMANN, S.; KOLMAR, H.; JAEGER, K. E. Functional Cell-Surface Display of a Lipase- Specific Chaperone. **ChemBioChem**, v.8, p. 55–60, 2007.
- WINKLER, F. K.; GUBERNATOR, K. **Lipases - their structure, biochemistry and application**. Cambridge University Press: Cambridge, 1994.

- WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, 993-999, 2002.
- YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373- 383, 2005.
- YOO, H-Y.; SIMKHADA, J. R.; CHO, S. S.; PARK, D. H.; KIM, S. W.; SEONG, C. N.; YOO, J. C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6104–6111, 2011.
- YOON, S.; KIM, S.; RYU, Y.; KIM, T. D. Identification and characterization of a novel (S)-ketoprofen-specific esterase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 1–7, 2007.
- YU, E. Y.; KWON, M-A.; LEE, M.; OH, J. Y.; CHOI, J-E.; LEE, J. Y.; SONG, B-K.; HAHM, D-H.; SONG, J. K. Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 3132-3137, 2010.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.8017-8021, 1988a.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p. 3194-3201, 1988b.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 82, p. 3192-3196, 1985.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. **Science** v. 224, p. 1249- 1251, 1984.
- ZHAO, L.; XU, J.; ZHAO, J.; PAN, J.; WANG, Z. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. **Process Biochem**, v.43, p. 626–633, 2008.

